BAND 35, HEFT 2 APRIL 1959

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 42 Abbildungen

1959
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 35 Heft 2 *S. 105—216 Berlin 1959*

Postverlagsort Berlin

NSP RAP
COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
6 MAY 1959

INHALT

Abhandlungen

BERCKS, R., Serologische Untersuchungen über das *Phaseolus*-Virus 1. Mit 3 Abb. .. 105

HEIN, A., Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräutern. IV. *Stachys palustris*, ein Wirt des Gurkenmosaikvirus. Mit 2 Abb. 119

VENKATA RAM, C. S., Cellulolytic activity and fungal nutrition with special reference to decomposition of bacterial cellulose by *Fusarium culmorum*. With 4 figures .. 122

KRANZ, J., Über sortenbedingte Anfälligkeit der Kartoffelknolle für *Fusarium caeruleum* (Lib.) Sacc. und *Phoma foveata* Foister und ihre Beeinflussung durch den Anbauort. Mit 9 Abb. 135

RADATZ, W., Untersuchungen zur „Gelbnervigkeit" der Apfelsinenblätter *Citrus aurantium sinensis* (Gall.). Mit 12 Abb. 148

LYR, H., und H. ZIEGLER, unter Mitarbeit von CH. HEFFE, Enzymausscheidung und Holzabbau durch *Phellinus igniarius* Quél. und *Collybia velutipes* Curt. Mit 9 Abb. 173

Kurze Mitteilungen

WETTER, C., L. QUANTZ und J. BRANDES, Verwandtschaft zwischen dem Stauchevirus der Erbse und dem Rotkleeadernmosaik-Virus (red clover vein mosaic virus). Mit einer Abbildung 201

BRANDES, J., Elektronenmikroskopische Größenbestimmung von acht stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren. Mit 2 Abb. 205

Besprechungen 211

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photogebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/Main, Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzes Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69. Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 25,60 DM **Einzelpreis 28,20 DM**

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusserologie, Braunschweig

Serologische Untersuchungen über das *Phaseolus*-Virus 1

Von

R. Bercks

Mit 3 Abbildungen

Chester hat im Jahre 1937 das Bohnenmosaik (bean mosaic) zu den Viren gerechnet, die serologisch nicht aktiv sind (6). Beemster und van der Want haben dagegen 1951 über positive Ergebnisse mit den *Phaseolus*-Viren 1 und 2 (Bohnenvirus 1 und 2, common bean mosaic bzw. bean yellow mosaic) berichtet (2). Sie erhielten im Spätsommer 1950 bei Versuchen mit dem Virus 1 serologische Reaktionen, wenn sie zentrifugierte, unverdünnte Säfte von kranken Pflanzen der Bohnensorte Beka verwendeten. Wegen der geringen Viruskonzentration in den zentrifugierten Säften benutzten die Autoren für ihre weiteren Versuche nicht die Präzipitations- sondern die Agglutinationsmethode (Beemster, briefl. Mitteilung). Sie erzielten bei Gewächshauspflanzen im August und September 1950 sowie im April 1951 positive Ergebnisse, aber nicht während der Wintermonate. Die Prüfung erfolgte mit unverdünnten, 1 : 2 und 1 : 4 verdünnten Säften. Hall (8, 9) erhielt bei seinen in den Jahren 1955 und 1956 veröffentlichten serologischen Untersuchungen mit den gleichen Viren keine zuverlässigen Reaktionen. Er schließt aus seinen Versuchen, daß frühere Angaben über die Gewinnung von Antiseren zweifelhaft sind. Eine Erklärungsmöglichkeit für die „erfolgreiche" Serumherstellung durch andere Autoren sieht er darin, daß in den für die Injektionen benutzten Präparaten stabile, aber nicht festgestellte Kontaminanten vorhanden waren.

Unsere vor mehreren Jahren aufgenommenen serologischen Untersuchungen waren zunächst ebenfalls auf beide Viren abgestellt. Da aber schon bald erhebliche Schwierigkeiten auftraten, beschränkten wir uns im wesentlichen auf das Bohnenvirus 1. Im folgenden wird über Versuche mit diesem Virus berichtet, die sich mit der Nachweismöglichkeit, Konzentrationsbestimmungen, Altersresistenz und Prämunität befassen.

Herstellung der Seren und Versuche zur serologischen Technik

Zur Serumgewinnung benutzten wir durch Einreibung infizierte *Phaseolus*-Pflanzen der Sorte Saxa. Den Preßsaft dieser Pflanzen zentrifugierten wir 5 Minuten bei 3000 U/min und dialysierten gegen fließendes Leitungswasser. Den nochmals bis zur Klärung (etwa 15′ bei 3000 U/min) zentrifugierten Saft injizierten wir Kaninchen intravenös (bis 10 Dosen von 1 bis 7 ccm ansteigend). Die Seren ergaben Titer bis zu 1 : 1280. Versuche zur Antigenreinigung durch Fällung mit Azeton schlugen fehl, dagegen gelang nach einem Vorschlag von WETTER (11), der in ähnlicher Weise bei dem Kartoffel-S-Virus verfährt, eine partielle Reinigung mit Äther. Wir gingen dabei wie folgt vor: Der Preßsaft wurde 5′ bei 3000 U/min (annähernd 1800 g) zentrifugiert, Sediment verworfen, Zentrifugat 2 Std. bei 15 000 U/min (etwa 25 000 g) zentrifugiert, Sediment in ein Fünftel der Ausgangsmenge mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, mit der gleichen Menge Äther versetzt, gut durchmischt und 10′ bei 3000 U/min zentrifugiert. Die klare, gelbliche Flüssigkeit unter der Ätherschicht wurde mit einer Pipette entnommen, nochmals 5′ bei 3000 U/min zentrifugiert und anschließend 2 Stunden gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert. Die auf diese Weise gewonnenen Seren hatten Titer bis zu 1 : 2560. Um die Antikörper gegen normales Bohneneiweiß auszuschalten, wurden die Seren mit Saft von gesunden Pflanzen vorbehandelt. Wie schon BEEMSTER und VAN DER WANT feststellten, erwies es sich als zweckmäßig, zur Absättigung verdünnte Säfte zu verwenden. In den meisten Fällen verdünnten wir den Saft mit physiologischer Kochsalzlösung (1 + 5) und versetzten das Serum mit dem verdünnten Saft (1 + 19). Das vorbehandelte Serum behielt seine Wirksamkeit etwa 14 Tage. Kein meßbarer Titerverlust trat während mehrerer Monate ein, wenn bei der Absättigung „Cialit" (Desinfektionsmittel der Farbwerke Hoechst) zugesetzt wurde. Fast alle Versuche wurden mit dem hinsichtlich seiner Symptomausbildung starken Isolat P 487 durchgeführt. Lange Zeit ließ es sich im Preßsaft serologisch höchstens bis zu einer Verdünnung von 1 : 32 nachweisen. Im Laufe der Untersuchungen änderte es aber aus unbekannten Gründen seine Konzentration derart, daß es bis zu Verdünnungen von 1 : 2048 nachweisbar war. Die im folgenden Abschnitt unter 1) bis 4) mitgeteilten Versuche wurden, sofern nicht anders bemerkt, ausschließlich zu einer Zeit unternommen, in der das Isolat nur einen geringen Titer ergab.

Für Prämunitäts- und einige orientierende Versuche verwendeten wir das schwache Isolat P 1075[1]).

Hinsichtlich der serologischen Technik prüften wir die Brauchbarkeit von nicht zentrifugierten sowie von verschieden stark zentrifugierten Säften und die Durchführung der Reaktionen in Röhrchen und auf Objektträgern (Tropfenmethode) bei verschiedenen Temperaturen. Rohe, nicht zentrifu-

[1]) Herrn Dr. L. QUANTZ (Institut für landwirtschaftliche Virusforschung) danke ich vielmals für die Überlassung der Virusisolate und von Saatgut sowie seinen Rat in symptomatologischen Fragen und die Durchführung einiger Infektiositätsteste mit der Sorte Top crop (Schalentest).

gierte Säfte neigten im Röhrchentest zu unspezifischen Ausfällungen mit Normalserum, außerdem versagte der Test in vielen Fällen, in denen Paralleluntersuchungen mit zentrifugierten Säften nach der Tropfenmethode positive Resultate ergaben. Schon eine schwache Klärung der Säfte (5′ oder 10′ bei 3000 U/min) führte im Röhrchentest bei 37 °C zu einer starken Abnahme der unspezifischen Reaktionen. Weit bessere Resultate erhielten wir aber mit klar zentrifugierten Säften, d. h. der Test sprach auch noch bei höheren Verdünnungen an.

Ein Vergleich des Röhrchentestes mit der Tropfenmethode zeigte für zentrifugierte Säfte keine wesentlichen Unterschiede, so daß wir uns, wegen der einfacheren Durchführung, auf die Tropfenmethode beschränkten. Für diese Methode prüften wir den Einfluß verschieden starken Zentrifugierens eingehender. Wir zentrifugierten Preßsäfte verschieden alter Blätter verschieden alter Pflanzen vergleichsweise 30′ in einer Laborzentrifuge bei 3000 U/min (annähernd 1800 g), in einer anderen Zentrifuge bei 6000 U/min (annähernd 5600 g) und in einer weiteren Zentrifuge bei 15 000 U/min (annähernd 25 000 g). Dabei ergab sich, daß durch hochtouriges Zentrifugieren (15 000 U/min) ein Teil des Virus ausgeschleudert wird, so daß die Konzentration im Saft abnimmt. Dies zeigte sich bei hochtitrigen Säften in einer Titerabnahme und bei geringem Virusgehalt in einem negativen Ausfall der serologischen Prüfung. Die bei 3000 bzw. 6000 U/min zentrifugierten Säfte verhielten sich hinsichtlich des serologisch gemessenen Virustiters gleich. Da bei 6000 U/min die Säfte aber besser geklärt wurden und deshalb auch eine bessere Bonitierung möglich war, wählten wir diese Zentrifugierungsart. Von Herrn Dr. Quantz vorgenommene Abreibungen von rohen Säften, von in der vorstehenden Art zentrifugierten Proben sowie des bei dem Zentrifugieren entstandenen Sediments auf Blätter der Buschbohnensorte Top crop im Schalentest (10) ergaben ebenfalls, daß bei der von uns gewählten Zentrifugation nur wenig Virus in das Sediment gelangte. Teilweise ergaben die zentrifugierten Säfte höhere Läsionszahlen als die nicht zentrifugierten.

Ergebnisse

1. Prüfung von künstlich infizierten und samenkranken Freiland- und Gewächshaus-Pflanzen

An künstlich infizierten und samenkranken Freilandpflanzen wurden im Sommer 1955 je etwa 600 Untersuchungen durchgeführt. Außer der in erster Linie verwendeten Sorte Saxa prüften wir folgende unterschiedlich anfälligen Sorten: Doppelte holländische Prinzeß, Nordstern, Herold, Gelbe Strohbohne, Immuna und Saxagold. Untersucht wurden nach Möglichkeit einzelne Blätter, in vielen Fällen mußten wegen der geringen Saftmenge zwei oder auch mehrere Blätter gemeinsam geprüft werden. Obgleich die Pflanzen symptomatologisch eindeutig als krank anzusprechen waren, gelang der Nachweis nur in sehr geringem Umfang und zwar bei den künstlich infizierten Pflanzen ungefähr zu 8 %. Es ließ sich keinerlei Beziehung zum Alter der Pflan-

zen, der Insertion der Blätter und dem Grad der Symptomausbildung beobachten. Ähnlich waren die Ergebnisse bei samenkranken Pflanzen.

An Gewächshauspflanzen führten wir in den Jahren 1955 und 1956 zu den verschiedensten Zeiten eine große Zahl von Infektionen fast ausschließlich an der Sorte Saxa durch und prüften wiederum nach Möglichkeit einzelne Blätter. Von sämtlichen Säften stellten wir Verdünnungsreihen her. Die Ergebnisse schwankten sehr, bei einigen Pflanzen fielen alle Reaktionen negativ aus, obwohl die Pflanzen eindeutig krank waren, während bei anderen alle Blätter positive Reaktionen gaben. In den meisten Fällen reagierten von einer Pflanze nur ein Drittel bis zwei Drittel der Blätter positiv. Der Verdünnungsendpunkt lag im allgemeinen bei 1 : 4 bis 1 : 8. Gelegentlich wurden Titer von 1 : 32 erreicht. Unspezifische Ausfällungen im Normalserum traten selten auf. Wie bei den Freilandpflanzen konnte keine Korrelation zwischen der serologischen Reaktion, der Insertion der Blätter und der Symptomausprägung festgestellt werden. In der Regel reagierte ein mehr oder weniger großer Teil der Blätter positiv, wenn die Zeitspanne zwischen Infektion und Prüfung nicht größer als etwa 4 Wochen war. Nach 2 oder 3 Monaten nahm die Zahl der positiv reagierenden Blätter einer Pflanze im allgemeinen stark ab.

Die Prüfungen von samenkranken Gewächshauspflanzen fielen durchweg negativ aus. Allerdings gelang der Virusnachweis in der Nachkommenschaft von Pflanzen, die wir mit dem Isolat P 487 nach dessen Virulenzsteigerung infiziert hatten. Wir untersuchten die Pflanzen, nachdem die ersten Fiederblätter voll entfaltet waren. Eine spätere Prüfung, bei der Herr Dr. QUANTZ parallel zu serologischen Untersuchungen Abreibungen auf Blätter der Sorte Top crop im Schalentest durchführte, bestätigte das erste Ergebnis und zeigte weitgehende Übereinstimmung zwischen den beiden Prüfungsverfahren.

2. Prüfung von Pflanzen, die bei konstanter Temperatur gewachsen waren

Samen der Sorte Saxa wurden im Gewächshaus in Töpfen ausgelegt, die Pflanzen nach dem Auflaufen an beiden Primärblättern infiziert und 3 Tage später in Klimakammern mit konstanter Temperatur und täglich 16stündiger Belichtung aufgestellt. Folgende Temperaturen wurden gewählt: 10 °, 20 °, 30 °C. Nach 12 Tagen waren die 10 °-Pflanzen kaum gewachsen und hatten noch keine neuen Blätter gebildet, Symptome waren nicht zu beobachten. Die 20 °-Pflanzen waren gut gewachsen, sie zeigten auf den mittleren Fiederblättern schwaches Mosaik, die Spitzenblätter rollten leicht. Bei den 30°-Pflanzen vergilbten die Primärblätter zum Teil schon, die Spitzenblätter rollten sich stark ein und hatten dunkelgrüne Flecke. Die einen Tag später vorgenommenen serologischen Prüfungen zeigten, daß die 10 °- und 30 °-Pflanzen in allen Primär- und Fiederblättern Virus enthielten, während bei den 20 °-Pflanzen die Primärblätter negative, die Fiederblätter dagegen positive Reaktionen ergaben. Die zur Kontrolle im Gewächshaus belassenen Pflanzen reagierten nur mit den oberen, gelegentlich auch noch mit den mitt-

leren Blättern positiv. Weitere Prüfungen an späteren Terminen bestätigten insofern diese Ergebnisse, als bei den 10 °- und 30 °-Pflanzen wiederum alle Blätter Reaktionen ergaben, während die der 20 °- und der Gewächshauspflanzen zu einem Teil nicht reagierten. Der Titer der Preßsäfte betrug im besten Fall 1 : 32. Er war im Durchschnitt bei den 30 °-Pflanzen am höchsten.

In einem weiteren Versuch infizierten wir am 20. März junge Pflanzen der Sorten Saxa, Nordstein und Doppelte holländische Prinzeß im Gewächshaus und stellten einen Teil am nächsten Tage in einer Klimakammer bei 15 °C und täglich 16stündiger Belichtung auf. Die im Gewächshause verbliebenen Pflanzen entwickelten sich bedeutend schneller als die in der Klimakammer. Vom 28. März bis zum 1. Oktober prüften wir in Abständen von ungefähr 14 Tagen jeweils einen Teil der Pflanzen an mehreren Blättern. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Sorten in Tabelle 1 ohne Berücksichtigung der Untersuchungstermine zusammengefaßt, da sich in diesem Versuch keine sicheren Unterschiede in der Nachweismöglichkeit zu bestimmten Zeiten feststellen ließen. Der Nachweis gelang immer nur in einem Teil der Proben.

Tabelle 1

	Saxa	Nordstern	Dopp. holl. Prinzeß
15 °C	74/193[1])	33/92	38/136
	38 %	36 %	28 %
Gewächshaus	66/258	40/106	41/180
	25 %	38 %	23 %

[1]) Von 193 Proben waren 74 positiv.

Er war für die Sorte Saxa bei den 15 °-Pflanzen zwar im Durchschnitt etwas besser als bei den Gewächshauspflanzen, aber keineswegs befriedigend. Bei den anderen Sorten traten unter den verschiedenen Bedingungen keine auswertbaren Unterschiede auf. Die Safttiter gingen nicht über 1 : 8 hinaus.

Weitere Untersuchungen befaßten sich mit dem Virus-Nachweis bei samenkranken Pflanzen. Für den ersten Versuch legten wir am 26. April Samen der Sorte Doppelte holländische Prinzeß im Gewächshaus in Töpfen aus. Am 7. Mai brachten wir die gerade aufgelaufenen Pflanzen in Kammern mit konstanter Temperatur von 20 ° bzw. 30 °C und täglich 16 Stunden Licht. Bei der ersten Prüfung am 10. Mai hatten die 20 °-Pflanzen verhältnismäßig gut entwickelte Primärblätter; Fiederblätter waren noch nicht entwickelt. Die 30 °-Pflanzen zeigten ein starkes Längenwachstum, die Primärblätter waren zum Teil erst schwach ausgebildet. Der serologische Nachweis gelang in keinem Fall. Die weiteren Prüfungen führten wir zunächst im Abstand von 2 bis 3 Tagen, später von etwa 7 Tagen durch. Das erste positive Ergebnis wurde bei beiden Temperaturen am 23. Juni erhalten. Erst am 26. Juli entsprach die Zahl der positiven Befunde bei den 20 °-Pflanzen dem Prozentsatz an kranken Pflanzen des Ausgangsmaterials. Von den 30 °-Pflanzen war zu diesem Zeitpunkt kein Material mehr vorhanden, so daß über sie nichts mehr ausgesagt werden kann.

In einem anderen Versuch wuchsen Pflanzen derselben Sorte bei einer konstanten Temperatur von 15 °C. Nach einem Monat ließ sich weder in Primär- noch in Fiederblättern serologisch Virus nachweisen.

Des weiteren wurden samenkranke, zuvor im Gewächshaus herangezogene Pflanzen der Sorte Saxa, die zum größten Teil schon die Primärblätter entfaltet hatten, am 1. August bei 15 ° bzw. 25 °C in Klimakammern aufgestellt. Die erste Prüfung erfolgte am 12. August, sie verlief negativ. Am 25. August gelang der Nachweis bei den 15 °-Pflanzen in wenigen Fällen an Primärblättern. Am 8. September entsprach bei den Primärblättern dieser Pflanzengruppe die Zahl der positiven Reaktionen dem Anteil samenkranker Pflanzen, während eine am folgenden Tage vorgenommene Prüfung von 56 Proben der Fiederblätter (jeweils 2 Blätter) nur in einem Fall positiv verlief. Eine weitere Prüfung war nicht möglich, weil das Versuchsmaterial verbraucht war. Die letzte Prüfung der 25 °-Pflanzen nahmen wir am 1. September vor, dabei ließ sich weder in Primär- noch Fiederblättern Virus nachweisen.

3. Versuche mit abgeschnittenen Blättern in Lösungen

Bei den vorstehend beschriebenen Untersuchungen waren, wenn überhaupt, nur geringe Virustiter zu verzeichnen. Wir versuchten deshalb, die Viruskonzentration zu erhöhen, indem wir abgeschnittene Blätter von kranken Pflanzen in feuchte Kammern bzw. in verschiedene Nährlösungen legten. Im einzelnen brachten wir Primär- und Fiederblätter verschiedenen Alters in folgende Medien:

1. Feuchte Kammern.
2. Lösung von Saccharose + $Ca(HPO_4)$. H_2O (10 g bzw. 0,2 g auf 1 l aq. dest).
3. Wie 2. + NH_4NO_3 (8 g auf 1 l).
4. Wie 3. + AZ-Lösung nach HOAGLAND.
5. Nährlösung nach VAN DER CRONE + AZ-Lösung nach HOAGLAND.
6. Citronensäure (0,003 m, mit KOH auf pH 5,6 eingestellt).
7. Wie 6. + AZ-Lösung nach HOAGLAND.
8. Malonsäure (0,003 m mit KOH auf pH 5,6 eingestellt).
9. Malonsäure (mit NH_4OH auf pH 6,3 eingestellt).
10. Malonsäure (mit NH_4OH auf pH 7,2 eingestellt).

Die Versuche wurden zum Teil mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse schwankten in gleicher Weise wie bei den Kontrolluntersuchungen von Blättern, die an den Pflanzen belassen worden waren. Höhere Viruskonzentrationen wurden im Durchschnitt ebenfalls nicht gefunden.

4. Versuche mit dialysierten Preßsäften

In anderen Versuchen bemühten wir uns festzustellen, ob sich die serologische Reaktion durch Dialyse der Pflanzensäfte verbessern ließ. Zunächst dialysierten wir Säfte von Primär- und Fiederblättern verschieden alter, künstlich infizierter Pflanzen 1 bis 5 Stunden bei Zimmertemperatur gegen

fließendes Leitungswasser. In den meisten Fällen reagierten die Kontrollen besser als dialysierte Säfte, die sogar manchmal keine Reaktionen ergaben. Gelegentlich wirkte sich eine kürzere Dialysierzeit schlechter als eine längere aus. Bei Dialyse gegen stehendes Wasser wurde eine braune Verfärbung beobachtet, die durch Einengung der Flüssigkeit bei 37 °C auf drei Viertel des Volumens zu einer abzentrifugierbaren Ausfällung führte. Durch Dialyse gegen Glyzerin bei 4 °C oder Zimmertemperatur wurde eine erhebliche Konzentrierung der Säfte erreicht. Sie wirkte sich bei der Sorte Saxa in einer eindeutigen Steigerung des Virustiters aus (z. B. von 1 : 16 auf 1 : 128). Wenn Preßsäfte von Blättern mit Symptomen vor der Dialyse keine Reaktionen ergaben, reagierten sie fast immer auch nach der Dialyse nicht. Nur in wenigen Ausnahmen kam es in solchen Fällen zu schwachen Reaktionen, die wegen der durch eingedrungenes Glyzerin erhöhten Viskosität erst bei Verdünnungen des Saftes zu erkennen waren. Bei orientierenden Versuchen mit anderen Bohnensorten konnten wir keine klaren Ergebnisse erzielen. Eine Konzentrierung des zentrifugierten Saftes und damit des Virus versuchten wir ferner mittels Filtration durch Filter, die das Virus zurückhielten („Ultrafeinfilter fein" der Membranfiltergesellschaft Göttingen). Bei einer Einengung von 20 ccm auf 5 ccm fanden Ausflockungen statt. Die Flocken wurden in einem Glashomogenisator möglichst fein zerrieben und die Flüssigkeit nochmals kurz zentrifugiert. Auch auf diese Weise erhielten wir teilweise eine eindeutige Titersteigerung. Wenn die Kontrollsäfte keine Reaktionen ergaben, reagierten die konzentrierten Säfte allerdings auch nicht.

5. pH-Empfindlichkeit

Der pH-Wert der Preßsäfte von gesunden und kranken Bohnenblättern schwankt zwischen 5,9 und 6,2. Durch Zusatz verschiedener Puffer (Borat, Citrat, Glykokoll, Phosphat, Veronal) wurde er in weiten Grenzen verändert, um die pH-Empfindlichkeit zu prüfen und festzustellen, ob durch pH-Verschiebungen die serologische Nachweismöglichkeit verbessert werden kann. Die auf die verschiedenen pH-Werte eingestellten Säfte prüften wir nach 20′ bis 24 Stunden serologisch, nachdem wir jeweils einen Teil wieder auf pH 6 gebracht hatten. Wegen der geringen Beständigkeit des Virus in vitro und seiner schwachen Konzentration führten wir die 24-Stunden-Versuche bei + 3 °C durch, während die Säfte für die kürzeren

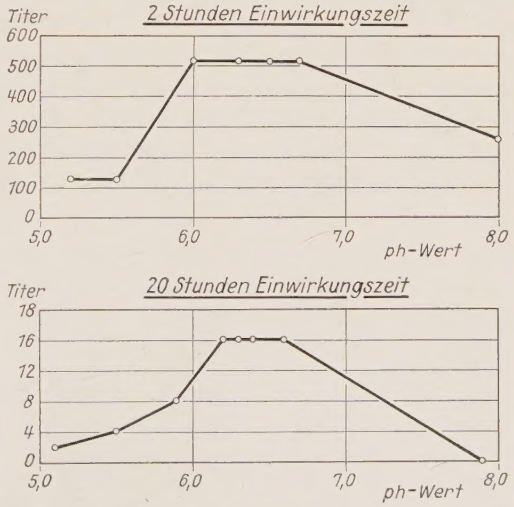


Abb. 1 u. 2. Abhängigkeit der serologischen Reaktion vom pH-Wert der Preßsäfte

Zeiten bei Zimmertemperatur belassen wurden. In Abhängigkeit von der Zeit nahm die serologisch nachweisbare Viruskonzentration unterhalb pH 5,3 und oberhalb pH 6,7 bis 7,0 ab. In späteren, nach Virulenzsteigerung des Isolates durchgeführten Versuchen konnte der pH-Einfluß genauer untersucht werden. Die Abbildungen 1 und 2 geben Beispiele für Versuche mit Glykokoll-Puffer. Nach 2 Stunden sank der Titer unterhalb pH 6 und oberhalb pH 6,7 deutlich ab. Nach einem 20stündigen Aufenthalt bei Zimmertemperatur war der Kurvenverlauf ähnlich, allerdings lagen die Werte, bedingt durch die geringe Beständigkeit des Virus, weit unter denen des 2-Stunden-Versuches. Der ursprüngliche pH-Wert betrug 6,2. In keinem Fall bewirkten pH-Verschiebungen gegenüber den unbehandelten Kontrollen bessere Titer.

6. Änderungen des Virusgehaltes während der Vegetationsperiode

Die während der ersten Jahre beobachtete niedrige Konzentration des Isolates P 487 und die dadurch bedingte schwierige Nachweismöglichkeit ließen zunächst keine auswertbaren Untersuchungen über Veränderungen des Virusgehaltes der Pflanze zu. Nachdem aber eine stark erhöhte Vermehrungsfähigkeit festgestellt wurde, konnten entsprechende Prüfungen durchgeführt werden. Wir beimpften zu diesem Zwecke im Gewächshause eine größere Zahl von jungen Pflanzen der Sorte Saxa an den Primärblättern und prüften, nach 14 Tagen beginnend, in Abständen von 7 bis 12 Tagen den Virustiter möglichst jedes einzelnen Blattes von durchschnittlich etwa 7 Pflanzen. Junge Blätter mußten gewöhnlich in einer gemeinsamen Probe untersucht werden. Für die Darstellung in Kurven ermittelten wir den durchschnittlichen Virustiter sämtlicher an einem Tage untersuchten Proben. Die Versuche wurden zu verschiedenen Jahreszeiten wiederholt (Infektionstermin der I. Serie 23. 1., der II. Serie 11. 3., der III. Serie 24. 5., der IV. Serie 4. 7.). Die Kurven aller vier Versuche zeigen die gleiche Tendenz, obschon unter dem Einfluß verschiedener Umweltfaktoren in Einzelheiten Unterschiede bestehen. Wir können uns deshalb auf die Wiedergabe zweier Versuche beschränken. Die Kurve der ersten Versuchsserie zeigt einen besonders klaren Verlauf (Abb. 3). 29 Tage nach der Infektion war die Viruskonzentration noch gering, sie stieg dann steil an und fiel ebenso steil wieder ab. Vom 42. bis 111. Tage (Versuchsende) hielt sich die Konzentration auf einem geringen, ungefähr gleichen Niveau. Die Kurve für die zweite Serie zeigt ebenfalls 25 Tage nach der Infektion noch einen geringen Virusgehalt. Ein folgender starker Anstieg, der nach allen anderen Untersuchungen mit Sicherheit anzunehmen ist, wurde nicht erfaßt, weil bis zum 45. Tage keine Prüfungen durchgeführt wurden. Zum Unterschied von der ersten Serie traten längere Zeit höhere, allerdings stark schwankende Konzentrationen auf. Sie dürften in erster Linie darauf zurückzuführen sein, daß sich bei älteren kranken Pflanzen stärker als bei gesunden noch Seitentriebe entwickelten, die einen höheren Virusgehalt hatten und damit den Gesamtvirusspiegel beeinflußten. Je nachdem ob bzw. wie viele

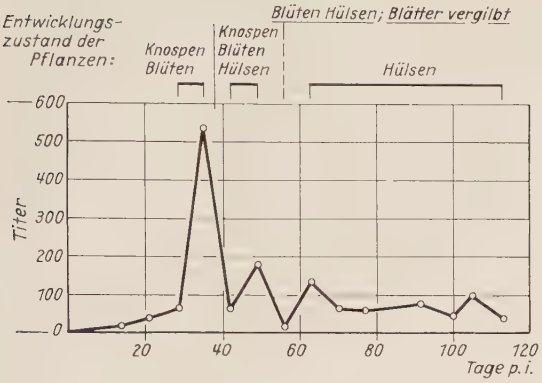
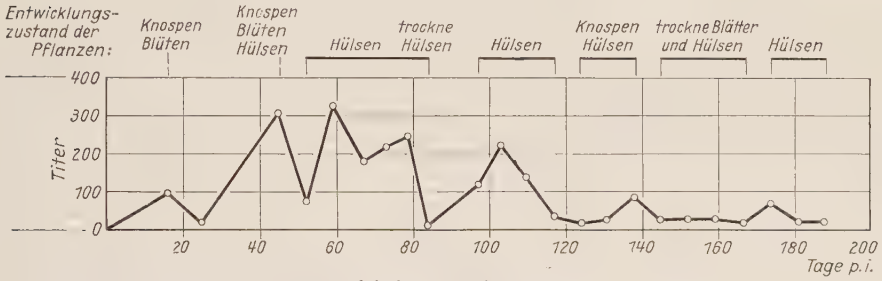


Abb. 3. Viruskonzentration im Verlauf der Vegetationsperiode

Kurve I. Infektionstermin 23. Januar 1957



Kurve II. Infektionstermin 11. März 1957

solcher Triebe zum Zeitpunkt der Untersuchung vorhanden waren, wurde ein verhältnismäßig hoher oder niedriger Virusgehalt festgestellt. Die sehr niedrige Konzentration 83 Tage nach der Infektion ist damit zu erklären, daß die zu diesem Termin untersuchten Pflanzen stark abgereift waren (trockene Hülsen) und keine neuen Triebe entwickelt hatten. Erst vom 119. Tage ab blieb der Virustiter unter 1 : 100 und veränderte sich bis zum Versuchsende am 191. Tage kaum noch. Die höchste Konzentration aller vier Serien lag bei einer Probe mit dem Titer 1 : 2048. Der höchste Durchschnittstiter von 1 : 704 wurde in der IV. Serie (Impftermin 4. 7.) und zwar schon nach 27 Tagen beobachtet. Die Pflanzen dieser Serie wuchsen übrigens sehr schnell und starben bereits nach 69 Tagen ab.

7. Altersresistenz

Um zu prüfen, wie weit eine künstliche Infektion durch das Alter der Pflanzen beeinflußt wird, säten wir im Abstand von 14 Tagen Bohnen der Sorte Saxa in Töpfen aus (I. Serie am 19. 5., II. Serie am 2. 6., III. Serie am 16. 6., IV. Serie am 30. 6.) und infizierten alle Serien gleichzeitig am 14. 7. mit dem virulenten Isolat. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Pflanzen der Serie I große, voll ausgebildete Hülsen, die der Serie II kleine Hülsen, die der Serie III Blüten, während die der Serie IV die ersten Fiederblätter entfalteten. Bei der Serie I wurden, da die Primärblätter abgestorben waren, je

Pflanze ein oder zwei Fiederblätter beimpft; die Serien II und III unterteilten wir und beimpften bei einem Teil Primärblätter und bei dem zweiten Teil Fiederblätter, bei Serie IV erfolgte die Beimpfung an Primärblättern. Die Pflanzen der ersten Serie entwickelten nach der Beimpfung keine neuen Blätter mehr, die der zweiten und dritten nur in wenigen Fällen. Für die nach 3 bis 4 Wochen durchgeführten serologischen Prüfungen stellten wir Verdünnungsreihen der Preßsäfte nach Möglichkeit von jedem Blatt getrennt her. Bei den 13 Pflanzen der Serie I ließ sich weder in den beimpften noch in den übrigen Blättern Virus nachweisen. Von den 15 an Primärblättern beimpften Pflanzen der Serie II reagierte ebenfalls keine positiv; von 11 an Fiederblättern beimpften dieser Serie erkrankten dagegen 6, allerdings waren Durchseuchung und Konzentration unterschiedlich, bei einer Pflanze ließ sich das Virus z. B. nur in den beiden Spitzenblättern nachweisen. In der Serie III reagierten von 12 an den Primärblättern eingeriebenen Pflanzen 5, von 13 an Fiederblättern eingeriebenen 11 positiv. Auch in diesen Fällen war die Durchseuchung nicht gleichmäßig, aber bei der zweiten Gruppe deutlich höher als bei der ersten, die in ihrem Krankheitsgrad den an den Fiederblättern beimpften Pflanzen der Serie II entsprach. Die 12 Pflanzen der Serie IV erkrankten sämtlich, und zwar mit geringen Ausnahmen an allen Blättern.

8. Prämunitätsversuche

Die unterschiedliche Nachweismöglichkeit des schwachen Stammes P 1075 und des starken Isolates P 487 ermöglichte es, serologisch die Prämunisierungsfähigkeit von P 1075 zu prüfen. Der in Tabelle 2 mitgeteilte Versuch zeigt, daß eine Prämunität erreicht wurde, wenn die Beimpfung mit

Tabelle 2

1. Beimpfung am 17. 3. an Primärblättern mit:	2. Beimpfung am 2. 4. an Primär- bzw. Fiederblättern mit:	Serologische Prüfung der Virustiter			
		25. 4.	30. 4.	7. 5.	21. u. 22. 5.
P 487		1 : 512[3]		1 : 256	1 : 128
P 1075			0	1 : 4	1 : 4
P 1075	P 487 Pr.[1]	0		1 : 4	1 : 8
P 1075	P 487 F.[2]	0		1 : 4	1 : 8
Saft gesunder Pflanzen	P 487 Pr.	1 : 256		1 : 512	1 : 512
» » »	P 487 F.	1 : 512		1 : 256	1 : 512
» » »	P 1075 Pr.		0	1 : 4	
» » »	P 1075 F.		0	1 : 8	1 : 8

[1]) Pr. = Beimpfung der Primärblätter.
[2]) F. = Beimpfung der unteren Fiederblätter.
[3]) Es wurden sämtliche Blätter mehrerer Pflanzen geprüft, angegeben ist nur der höchste Titerwert; besonders bei den geringeren Werten (1 : 4 und 1 : 8) ist zu bemerken, daß ein großer Teil der einzelnen Prüfungen negativ verlief.

P 487 14 Tage nach der Beimpfung von Primärblättern mit P 1075 erfolgte. Die schwachen Titer, welche bei der Zweitverimpfung mit P 487 nach längerer Zeit festgestellt wurden, sind, wie die Kontrollen ausweisen, auf den Stamm P 1075 zurückzuführen. Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn wir für die Erst- und Zweitbeimpfung dieselben Fiederblätter verwendeten. Nahmen wir die Zweitverimpfung aber an einem anderen, etwas jüngeren Fiederblatt vor, so erhielten wir nicht in allen Fällen einen Schutz. Offenbar hatte sich das erste Virus in einem Teil der Blätter noch nicht so vermehren können, daß der Abwehrmechanismus in Kraft treten konnte. Bei anderen Versuchen mit Intervallen von 8 bis 10 Tagen zwischen Erst- und Zweitbeimpfung derselben Blätter trat ebenfalls nur teilweise eine Schutzwirkung ein.

Besprechung

Unsere Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von Beemster und van der Want, nach denen es möglich ist, Antiserum gegen das Bohnenvirus 1 herzustellen. Die von Hall geäußerten Zweifel sind deshalb unberechtigt. Es ist denkbar, daß die negativen Ergebnisse dieses Autors auf eine ungenügende Immunisierung und auf eine geringe Vermehrungsrate der von ihm verwendeten Isolate zurückzuführen sind. Ähnlich wie die genannten Verfasser beobachteten wir unspezifische Reaktionen. Sie ließen sich aber in unseren Versuchen durch Dialyse nicht wesentlich einschränken, so daß wir darauf verzichteten, die Preßsäfte vor der Untersuchung zu dialysieren, zumal die unspezifischen Ausfällungen bei höheren Verdünnungen nicht mehr so große Schwierigkeiten machten. Im Gegensatz zu Beemster und van der Want haben wir mit zentrifugierten Säften gearbeitet, weil rohe Säfte in weit höherem Maße zu unspezifischen Reaktionen neigten und nicht so hohe Titer ergaben wie die zentrifugierten. Wenn Beemster und van der Want mit rohen Säften bessere Ergebnisse erzielten als mit zentrifugierten, dürfte das daran gelegen haben, daß sie verhältnismäßig hochtourig zentrifugierten. Bei zu starkem Zentrifugieren konnte die Viruskonzentration auch in unseren Versuchen bis unter die Nachweisbarkeitsgrenze absinken.

Die Schwierigkeit des serologischen Nachweises des Bohnenvirus 1 ist in erster Linie durch seine offenbar im allgemeinen geringe Konzentration bedingt. Nach künstlichen Infektionen im Gewächshaus gelang uns der Nachweis bei einer genügenden Zahl von Prüfungen und der richtigen Wahl des Untersuchungstermins auch bei schwach virulenten Stämmen. So wurden positive Reaktionen mit dem Isolat P 1075 nach 5 bis 7 Wochen gewonnen. Unter ausreichenden Gewächshausbedingungen erzielten wir positive Ergebnisse zu jeder Jahreszeit. Unsere nur in beschränktem Umfange durchgeführten Versuche bei konstanten Temperaturen zeigen, daß auch für die Vermehrung des Bohnenvirus 1 die Temperatur eine Rolle spielt. Im Freiland gelingt eine Identifizierung des Virus nur in sehr begrenztem Umfange. Nach der Ansicht von Quantz (mündliche Mitteilung) sowie auch nach unserem Eindruck handelt es sich bei den in der Natur verbreiteten Stämmen vielfach um schwach

virulente, d. h. um solche, die nur eine geringe Konzentration erreichen. Da die jeweiligen Umweltbedingungen einen nicht bekannten Einfluß ausüben, ist es zur Zeit unmöglich, einen für den serologischen Nachweis günstigen Zeitpunkt festzulegen. Hinzu kommt, daß der Infektionstermin in vielen Fällen nicht mit genügender Sicherheit festzustellen ist und daß offenbar eine verhältnismäßig lange Zeit vergehen muß, ehe die Viruskonzentration, falls überhaupt, die für den serologischen Nachweis notwendige Höhe erreicht.

Die Virulenzänderung des Isolats P 487 zeigt, daß es auch Stämme mit hohen Konzentrationen gibt, die den Nachweis schon 14 Tage nach der Infektion erlauben. In derartigen Fällen scheint der Verlauf der Viruskonzentration während der Vegetationsperiode ähnlich wie bei manchen anderen Viren zu sein. Es läßt sich eine auffallende Übereinstimmung zwischen der Kurve I und einer früher ermittelten Kurve, die die Änderungen der Kartoffel-X-Viruskonzentration in Tabakpflanzen wiedergibt, feststellen (5, S. 218).

In anderen früheren Untersuchungen mit dem Kartoffel-X-Virus haben wir bei Kartoffelpflanzen eine Altersresistenz gegen dieses Virus beobachtet (z. B. 3,4). BEEMSTER (1) hat in letzter Zeit einen weiteren Beitrag zu dieser Frage geliefert. Unsere hier mitgeteilten Ergebnisse zeigen, daß Bohnen eine Altersresistenz gegen das Bohnenvirus 1 haben und daß diese Resistenz sowohl vom Alter der ganzen Pflanze als auch vom Alter der beimpften Blätter abhängig ist. Es dürfte nicht zu bezweifeln sein, daß eine Altersresistenz zumindest gegen die meisten Viren und bei den meisten Wirtspflanzen besteht.

FRANDSEN hat bei Prämunitätsversuchen mit zwei Stämmen des Bohnenvirus 1 keine volle Schutzwirkung erhalten und schließt daraus, daß „höchstens von einer partiellen Prämunitätswirkung" gesprochen werden kann (7, S. 399). Der Autor hat für die erste und zweite Beimpfung eine Zeitspanne von 7 Tagen gewählt, da er auf Grund anderer Versuche diese Zeit für eine systemische Ausbreitung des zuerst verimpften Virus als gesichert ansieht. In unseren Versuchen kamen wir bei einem gleichen Zeitintervall zu ähnlichen Ergebnissen. Wenn wir aber den Zeitraum auf 14 Tage ausdehnten, erreichten wir einen vollen Schutz. Obgleich die mit verschiedenen Isolaten erhaltenen Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragbar sind, möchten wir doch annehmen, daß FRANDSEN bei einer stärkeren Variierung der Zeitspanne ebenfalls eine volle Schutzwirkung erzielt hätte.

Zusammenfassung

Für den serologischen Nachweis des Bohnenvirus 1 erwies es sich als zweckmäßig, mit zentrifugierten Preßsäften zu arbeiten. Die im allgemeinen verhältnismäßig niedrige Viruskonzentration ließ sich bei Gewächshauspflanzen erfassen, wenn die Prüfungen zu einem richtigen Zeitpunkt und an mehreren Blättern durchgeführt wurden. Für ein sehr virulentes Isolat konnten die Änderungen der Viruskonzentration über die ganze Vegetationsperiode verfolgt werden.

Versuche in Klimakammern zeigten einen Einfluß der Temperatur auf die Virusverseuchung der Pflanzen und damit auf die Nachweisbarkeit. Bei Freilandpflanzen gelang der Nachweis nur in einem sehr unbefriedigendem Umfange.

In Gewächshausversuchen wurde eine Altersresistenz festgestellt.

Die Infektion mit einem schwachen Stamm bewirkte eine Prämunität gegen ein starkes Isolat.

Summary

Serological investigations on *Phaseolus* virus 1

The investigations showed, in confirmation of the results of Beemster and van der Want, and in contradiction of the view of Hall, that *Phaseolus* virus 1 is serologically active. Antisera with a titer of 1 : 2048 were produced.

In demonstrating the presence of the virus it was a help to centrifuge the expressed sap; however, excessive centrifuging could under certain circumstances reduce the virus concentration to such an extent that no serological reaction could be obtained. Dialysis against glycerine brought about a concentration of the expressed sap and so of the virus.

In greenhouse experiments, which were carried out chiefly with the bush bean variety Saxa, the presence of the virus could be demonstrated at all times of the year, though it was necessary to choose the right time and in certain cases to test several leaves of a plant. The highest virus titer demonstrated in these experiments was 1 : 32. For one very virulent isolate, which obviously constituted an exception, a virus titer of 1 : 2048 could however be observed. With this isolate the course of the virus concentration throughout the entire growth period was traced. The same relationships were observed as in earlier experiments with potato virus X in tobacco plants.

Experiments in climatically controlled chambers showed that temperature influences the infection of the plants by the virus and hence the possibility of demonstrating its presence.

In plants growing in the field the demonstration of the presence of the virus was only partially successful.

Infection experiments on plants of different ages showed the existence of resistance conditioned by age.

Experiments with a weak and a very strong isolate showed complete premunity after infection with the weak isolate.

Fräulein G. Querfurth danke ich vielmals für die Durchführung der Versuche, für ihre Anregungen sowie für ihre Hilfe bei der Auswertung.

Literaturverzeichnis

1. Beemster, A. B. R., 1958: Transport van X-Virus in de aardappel (*Solanum tuberosum* L.) bij primaire infectie. T. Plantenziekten **64**, 165—262.

2. — —, and J. P. H. van der Want, 1951: Serological investigations on the *Phaseolus* viruses 1 and 2. Antonie van Leeuwenhoek **17**, 285—296.

3. Bercks, R., 1951: Weitere Untersuchungen zur Frage der Altersresistenz der Kartoffelpflanzen gegen das X-Virus. Phytopath. Z. **18**, 249—269.

4. — —, 1952: Fortgeführte Freilanduntersuchungen über die Altersresistenz von zwei Kartoffelsorten gegen das X-Virus. Züchter **22**, 85—91.

5. — —, 1954: Untersuchungen über Änderungen des Virusgehaltes in Tabakpflanzen während der Vegetationsperiode. Phytopath. Z. **22**, 215—226.

6. Chester, K. St., 1937: Serological studies of plant viruses. Phytopathology **27**, 903—912.

7. Frandsen, N. O., 1952: Untersuchungen zur Virusresistenzzüchtung bei *Phaseolus vulgaris L.* I. Phytopathologische Untersuchungen. Z. f. Pflanzenzüchtung **31**, 381—420.

8. Hall, D. H., 1955: Studies on serology of cucurbit and bean viruses. Madison, Wis., Phil. Diss., 52 p.

9. — —, 1956: Studies on serology cucurbit and bean viruses. Dissertation abstracts. Ann. Arbor, Mich., **16**, 219.

10. Quantz, L., 1957: Ein Schalentest zum Schnellnachweis des Gewöhnlichen Bohnenmosaikvirus (*Phaseolus*-Virus 1). Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunscheig) **9**, 71—74.

11. Wetter, C., R. H. Bagnall, and R. H. Larson: Differential host and serological relationships of potato virus M, potato virus S and carnation latent virus. Phytopathology (im Druck).

Aus der Biologischen Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,
Institut für Phytopathologie Aschersleben
Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski

Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräutern

IV. *Stachys palustris*, ein Wirt des Gurkenmosaikvirus

Von

Alice Hein

Mit 2 Abbildungen

Mit *Stachys palustris* L.[1]) wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen zum ersten Male ein ausdauernder Unkrautwirt für das Gurkenmosaikvirus beobachtet. Er muß nach Durchsicht der uns zugänglichen Literatur als ein bisher nicht beschriebener Wirt für dieses Virus angesehen werden und ist infolge seiner weiten Verbreitung vielleicht von einiger Bedeutung für seine Überwinterung. Infiziert erscheinende Pflanzen wurden 1956 und 1957 in großer Zahl in Obstanlagen am Stadtrande von Naumburg (Saale) und Aschersleben gefunden. Sie waren im Mai und Juni von offensichtlich gesunden durch eine stärkere Aufbeulung der Interkostalfelder unterscheidbar (Abb. 1) und durch eine diffuse, an den voll entfalteten Blättern auch deutlich abgesetzte hellgrüne bis gelbgrüne Adernbänderung (Abb. 2). Diese Symptome waren häufig nur auf die oberen Blattpaare, manchmal auch nur auf den Grund dieser Blätter beschränkt. Da infolge zu erwartender Bodenbearbeitungsmaßnahmen eine weitere Freilandbeobachtung nicht möglich erschien und auch durch die starke Verflechtung gesunder und infizierter Wurzelausläufer erschwert gewesen wäre, wurden Einzelpflanzen ausgegraben und ins Gewächshaus gebracht. Die Symptome änderten sich an solchen Pflanzen während des Sommers kaum, doch erwiesen sich einige, die ursprünglich als gesund angesprochen worden waren, als infiziert. Auf der anderen Seite konnte nach längerem Stehen im Gewächshause das Virus nicht von allen infiziert erscheinenden Pflanzen isoliert werden, auch nicht von solchen, von denen kurz nach dem Umsetzen ein Isolierungsversuch geglückt war. Als Ursache dieser Erscheinung wurde zunächst die Bildung von Hemmstoffen

1) Für die Bestimmung habe ich Herrn Dr. Gliemroth, Naumburg, zu danken.

Abb. 1. Ausgegrabene Freilandpflanzen aus Naumburg. Links: infiziert; rechts: gesund; ausgegraben: 5. Mai 1957; photographiert: 10. Mai 1957

mit zunehmender Alterung der Pflanzen angenommen. Es wurden daher Preßsäfte von solchen Pflanzen auf ihre Hemmwirkung gegenüber einer Gurkenmosaikvirus (GMV)-Isolierung von *Mercurialis annua* L. (HEIN 1957 b) und einem Gelbstamm des Tabakmosaikvirus geprüft. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine Hemmwirkung dieser Preßsäfte.

Es gelang auch in keinem Falle, junge, eingetopfte, gesunde Freilandpflanzen durch mechanische Abreibung zu infizieren. Die Versuche zur Infektion gesunder *Stachys palustris* wurden mit einer der *Stachys*-Isolierungen und mit dem GMV-Stamm aus *Mercurialis annua* im August 1956 und im Juli und August 1957 zu jeweils 21 Pflanzen unter Verwendung von Karborund durchgeführt. Übertragungsversuche mit Insektenvektoren erfolgten wegen des vorzeitigen Abbruches der Arbeiten nicht.

Abb. 2. Blattsymptome bei *Stachys palustris L.* Links: gesund; rechts: infiziert; ausgegraben: 5. Mai 1957; photographiert: 10. Mai 1957

Da uns aus Samen erzogene *Stachys palustris* nicht zur Verfügung standen, wurden aus Samen erzogene *S. lanata* Crtz., *S. rectus* L. und *S. grandiflorus* (Steven) Benth. mit drei der Isolierungen mechanisch unter Verwendung von Karborund zu infizieren versucht. Die Preßsäfte dafür wurden aus *Nicotiana glutinosa* L., die 5 Wochen vorher inokuliert worden waren, hergestellt. Mit jeder der Isolierungen wurden 7, bei *Stachys grandiflorus* 3 Pflanzen beimpft. Nur eine *Stachys lanata* wurde infiziert und bildete

die gleichen Symptome aus, die für die Freilandpflanzen von *S. palustris* angegeben wurden. Sie zeigte außerdem eine Wuchshemmung und wirkte insgesamt gelbgrüner gefärbt als die nichtinfizierten Pflanzen. Diese Beobachtung und die Tatsache, daß sämtliche erhaltenen 7 Isolierungen des Virus von Pflanzen mit den oben beschriebenen Symptomen erhalten wurden, läßt uns als sicher annehmen, daß diese die Reaktion von *Stachys palustris* auf eine Infektion mit dem Gurkenmosaikvirus darstellen.

Die Identifizierung der Isolierungen erfolgte, wie früher beschrieben (Hein 1957 b), durch Preßsaftübertragungen zu *Spinacia oleracea* L., Sorte Matador; *Vigna sinensis* (L.) Endl., *Vicia faba* L., *minor*, Sorte Kleine Thüringer; *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L., Sorte Samsun; *N. glutinosa* L.; *Petunia hybrida* Hort.; *Cucumis sativus* L., Sorte Delikateß und *Lactuca sativa* L., Sorte Hohlblättriger gelber Butterlattich. Bei den stärker differenzierenden Wirtspflanzen *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum* und *Petunia hybrida* variierte die Symptomausprägung bei Parallelabreibung der 7 Isolierungen, lag jedoch innerhalb der für das Gurkenmosaikvirus typischen Variation. Die Zuordnung zum Gurkenmosaikvirus wurde gestützt durch Prämunitätstests mit 5 der Isolierungen und einem Gelbstamm des Gurkenmosaikvirus. Sie verliefen sämtlich positiv.

Es sei auf einen Irrtum hingewiesen, auf den mich freundlicherweise Herr Dr. V. Valenta, Bratislava (schriftliche Mitteilung) und Herr Dr. O. Lovisolo (1958) aufmerksam machten. Es handelt sich bei der in der 2. Veröffentlichung dieser Reihe (Hein 1957 a) genannten und abgebildeten Wirtspflanze für das „Gelbmosaikvirus" nicht um *Lamium purpureum* L., sondern um *Ballota nigra* L. Die Virose dürfte damit identisch sein mit der von Eristavi (1941) beschriebenen Erscheinung.

Literaturverzeichnis

Eristavi, E. M., 1941: Die Viruskrankheiten der Pflanzen in der Grusinischen SSR. In: Plant virus diseases and their control. Acad. sci. USSR, Moskau—Leningrad, 294—308 (russisch).

Hein, A., 1957 a: Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräutern. II. Das Luzernemosaik- und das *Lamium*-Gelbmosaikvirus. Phytopath. Z. **29**, 79—116.

— —, 1957 b: Beiträge zur Kenntnis der Viruskrankheiten an Unkräutern. III. Das Gurkenmosaikvirus. Phytopath. Z. **29**, 204—229.

Lovisolo, O., 1957: Virus e piante spontanee. I. „Mosaico lieve del *Lamium*" nuovo virus di tipo maculatura anulare. Boll. Staz. Pat. Veget. **15**, 89—137.

From the University Botany Laboratory — Madras-5

Cellulolytic activity and fungal nutrition with special reference to decomposition of bacterial cellulose by *Fusarium culmorum*

By

C. S. Venkata Ram

With 4 figures

Introduction

In a previous paper by the author (Venkata Ram, 1956) the cellulolytic activity of twenty-three species of *Fusarium* on bacterial and filter paper cellulose was reported. It was observed that four species which digested cellulose membranes, to varying extent, were unable to decompose filter paper supplied as carbon substrate in the nutrient media. The pH optima for activity of the *Fusarium* culture filtrates on re-precipitated cellulose also varied with the species. It is now well recognized that degradation of cellulose by fungi depends largely on the chemical composition of the substrate (Siu and Reese, 1953). Although the intrinsic nature of the cellulose substrate would largely determine its susceptibility, the greater the degree of crystallinity the greater the resistance offered by the cellulosic material to decomposition (Siu, 1951), nutritional factors play an important part in influencing the susceptibility of cellulose substrate to microorganisms. The practice of investigating fungal nutrition with reference to cellulolytic activity on cotton fabrics and filter paper is likely to be hampered by the fact that these two cellulosic materials contain many inorganic and organic impurities. It is also difficult to obtain a correlation between growth and decomposition on these substrates. A technique has been recently developed by the author for quantitative estimation of rate of growth and cellulolytic activity of fungi on pure cellulose discs, biosynthesized by *Acetobacter xylinium*. These discs, which are in the form of a membrane, are produced under controlled conditions to give uniformity of the cellulose material. The nutrient status of the substrate is regulated by altering the composition of the nutrient solution to which the cellulose discs are treated. This technique was employed in studying fungal nutrition with reference to cellulolytic activity of *Fusarium culmorum* and the results of such an investigation are presented in this paper.

Material and methods

The test organism, *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc., was obtained from the Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland. Uniform 9 cm. wide discs of the cellulose membrane produced by *Acetobacter xylinium* were prepared as described earlier (Venkata Ram, 1956). The membranes were thoroughly washed in distilled water, soaked in nutrient so-

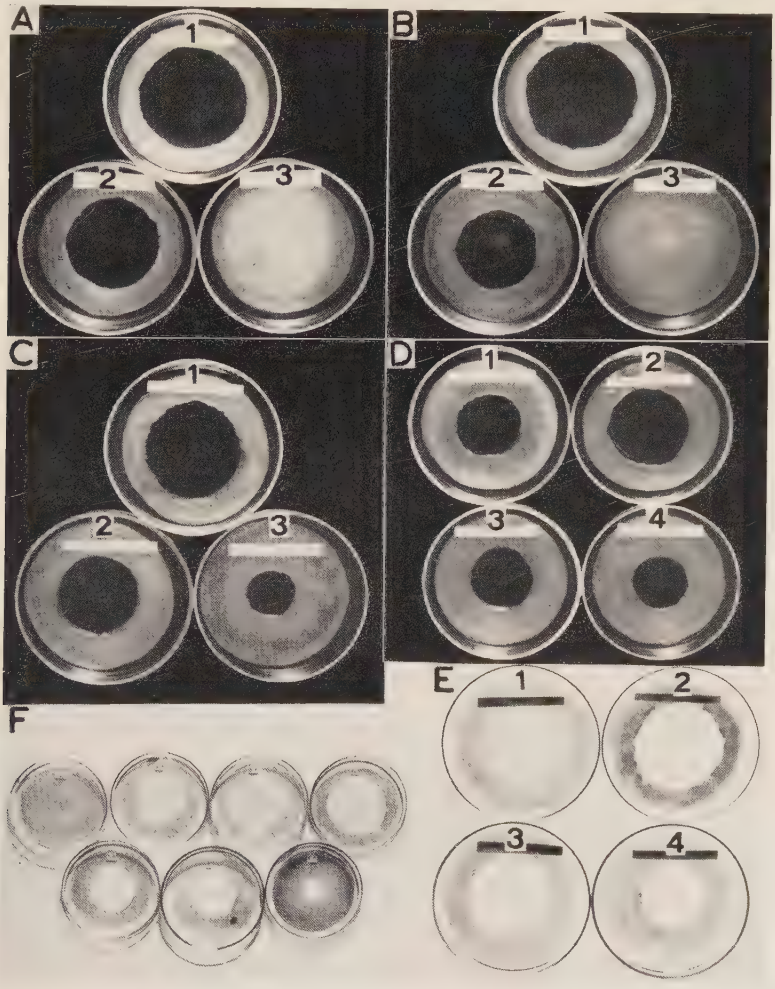


Fig. 1. A—C showing decomposition of bacterial cellulose in supplements of sucrose (A), glucose (B) and cellobiose (C) at concentrations of 0.4 gram per cent (1), 1.0 % (2) and 2.0 % (3). D-influence of Mg at 0.0079 gram per cent (1), 0.0158 % (2), 0.0237 % (3) and 0.0316 % (4) on decomposition of bacterial cellulose. E — Cellulolytic activity at different nitrogen levels, (1) 0.033 gram per cent, (2) 0.066 %, (3) 0.132 % and (4) 0.198 %. F — Cellulose decomposition as influenced by pH, top row from left to right pH 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0, bottom row pH 7.0, 8.0 and 9.0 (dark colour in the substrate was produced on addition of indicator solution)

lution, autoclaved and after 3 days one such membrane was transferred to a 10 cm. Petri dish. The surface moisture on the membrane was removed with a filter paper, the dishes autoclaved and the membranes inoculated in the centre with uniform discs punched out from a young colony of *F. culmorum* growing on 2 % water-agar medium, maintaining three replicates in each treatment. After incubation for 5 days at 25 °—29 °C., first the radial spread of the fungus on the cellulose discs was measured, after which the surface of the membrane was rubbed gently with a glass spatula. The cellulose liquefied under the action of the fungus separated into a jelly like mass which was removed and the diameter of the circular zone produced by removal of the decomposed cellulose (Fig. 1) was measured. From the figures thus obtained for growth and decomposition the area covered by the fungal colony and the area of liquefaction were calculated. These values (mean of three readings) have been presented as percentage/decomposition, taking the total area of the membrane as 100. Comparative studies were also made on the activity of *F. culmorum* on filter paper cellulose employing the technique described earlier (VENKATA RAM, 1956). Percentage filter paper decomposed by the fungus was determined after cellulolytic activity had progressed for 3 weeks at 25 °—29 °C.

The basal medium used as nutrient solution was of the following composition: KNO_3 — 5.0 g., KH_2PO_4 — 2.5 g., $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 1.25 g., $FeCl_3$ — trace, distilled water — 1 l. The initial pH of the medium was adjusted to 5.5 and the solution was autoclaved at 15 lb. pressure for 15 minutes. All chemicals employed were of 'Analar' grade and the distilled water was collected from an 'all glass' Pyrex still. The concentration of N, P, K and Mg in the medium was adjusted at different levels by varying the concentration of their corresponding salts in the substrate and in each series gradient in concentration of one element was obtained, whilst maintaining the levels of the other three elements in the basal medium. For K series, NaH_2PO_4 and $NaNO_3$ equivalents were substituted for KH_2PO_4 and KNO_3, respectively, level of K being adjusted by employing different concentrations of KCl. Similarly, for N series KCl was added to the medium to give the equivalent of potassium in 5 g. KNO_3 and gradient in N levels obtained by adding different quantities of $NaNO_3$. Levels of P were adjusted with NaH_2PO_4 and the equivalent of potassium in KH_2PO_4 was supplied as KCl.

Results

Inorganic nutrients and cellulolytic activity: Graphs for cellulolytic activity of *F. culmorum* on filter paper and bacterial cellulose in gradient concentrations of N, P, K and Mg in the basal medium are included in Fig. 2. From the curves it was obvious that decomposition of bacterial cellulose was more sensitive to altered concentrations of the nu-

trients in the basal medium than filter paper cellulose. No growth/decomposition occurred in the nitrogen deficient medium. Maximum degradation of both filter paper and bacterial cellulose was achieved at 4 g./l. $NaNO_3$, corresponding to 0.066 g. % N in the basal medium. Cellulolytic activity at 0.132 % N level (8 g./l. $NaNO_3$) was comparable to that at 0.066 % level but declined sharply in the case of bacterial cellulose at the higher concentrations, i. e., 0.198 % N (Fig. 1, E).

In the P amended series growth on cellulose membranes was marked even when the substrate contained no phosphorus. However, no cellulolytic activity on the bacterial cellulose was observed in the minus P substrate. Growth of *F. culmorum* on the cellulose discs increased sharply with the addition of 1 g./l. NaH_2PO_4, i. e., 0.0258 gram per cent phosphorus, but thereafter very little change in percentage growth was noticed (Fig. 2). As opposed to this, cellulolytic activity on this substrate increased markedly with each increase in concentration of P upto a level of 3.4 g./l. NaH_2PO_4, equivalent to 0.0877 % phosphorus. Parallel increase in cellulolytic activity was also recorded on filter paper. For the decomposition of both bacterial as well as filter paper cellulose the optimal concentration of P was found to be 0.0877 %, among the various levels tried.

Degradation of both the cellulosic materials occurred to some extent in substrate lacking in potassium (Fig. 2). This is attributed to traces of K which was possibly carried over in the fungal inoculum. Maximum cellulolytic activity on bacterial and filter paper cellulose was detected at the lowest concentration of potassium tried, namely 2 g./l. KCl or 0.105 gram per cent K. Cellulose decomposition decreased at higher K levels but more sharply in the case of bacterial cellulose than in filter paper. On the other hand, percentage growth on bacterial cellulose was highest at 7.4 g./l. KCl (0.3885 % K).

Optimal concentration of Mg in the nutrient solution for growth and cellulolytic activity of *F. culmorum* on bacterial and filter paper cellulose (Fig. 2) was found to be 0.0158 gram per cent (1.6 g./l. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$). At the higher, 0.0237 % and 0.0316 %, Mg levels the rate of decomposition of bacterial cellulose declined markedly (Fig. 1. D), whereas on filter paper only a slight decrease in cellulolytic activity was observed.

pH of the substrate and cellulolytic activity: The initial pH of the basal medium was adjusted to 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 for investigating the influence of hydrgen-ion concentration in the substrate on cellulolytic activity of *F. culmorum*. Results are presented in Fig. 3.

No cellulolytic activity was discernible on bacterial cellulose at pH 3.0, whereas 27 % of the filter paper supplied to the nutrient solution as the sole source of carbon was digested at this pH level. Radial growth of *F. culmorum* on bacterial cellulose at pH 3.0 extended only up to 8 % of the total area. At pH 4.0 growth and decomposition were 55 and 30 per cent, respectively, on

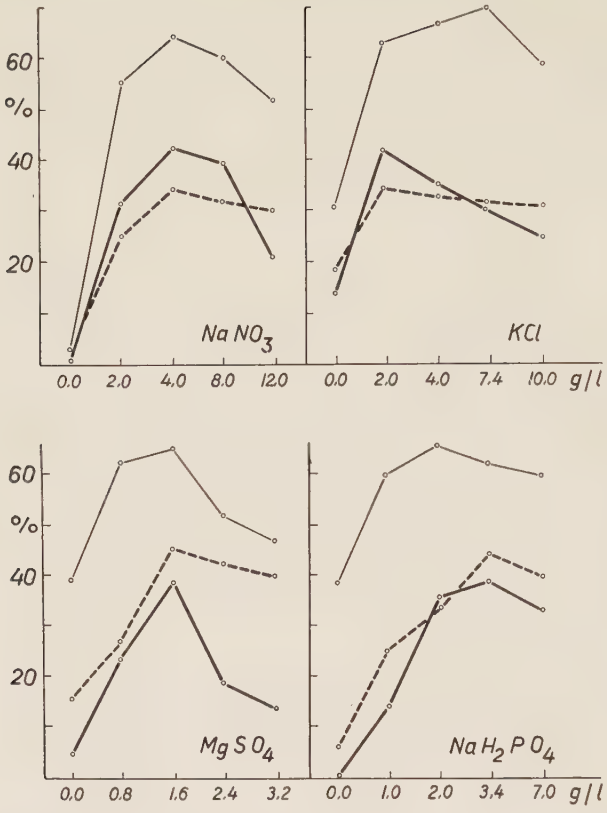


Fig. 2. Percentage decomposition of filter paper and bacterial cellulose by *Fusarium culmorum* as influenced by N, P, K and Mg concentrations in the substrate. (Thick continuous lines represent decomposition and thin lines growth on bacterial cellulose, thick broken lines indicate degradation of filter paper.)
Abscissa: g/l substances.
Ordinates: percentage growth/decomposition

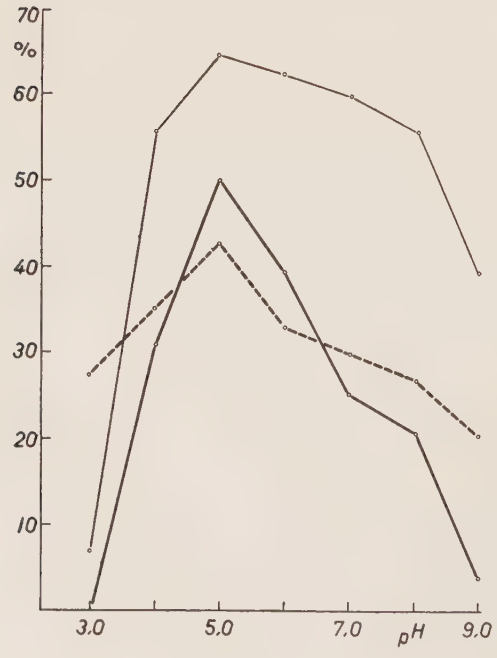


Fig. 3. Cellulolytic activity of *Fusarium culmorum* on bacterial membrane (thick lines) and filter paper (thick broken lines) as influenced by hydrogen-ion concentration in the substrate. (Thin lines represent growth on bacterial cellulose.)
Abscissa: Initial pH level.
Ordinates: percentage growth/decomposition

the cellulose discs and increased maximum to 64 and 50 per cent, respectively, at pH 5.0. Thereafter, decomposition of bacterial cellulose declined sharply at the higher pH levels and at pH 9.0 only 4 % decomposition was recorded. Growth on the cellulose membranes was highest at pH 5.0, declined gradually with increase in pH levels from 6.0 to 8.0 and fell sharply at pH 9.0 (Fig. 1. F). Degradation of filter paper in the nutrient solution at different pH levels followed the same pattern as that of bacterial cellulose but fluctuations in percentage decomposition at different pH levels was not as striking as in the case of bacterial cellulose.

Trace element supplements and cellulolytic activity: Mn, Zn and B as $MnSO_4$, $ZnSO_4$ and H_3BO_3, respectively, were added to the basal medium to give final concentrations of 10, 25, 50 and 100 ppm. of the element and the effect of these on the cellulolytic activity of *F. culmorum* on bacterial and filter paper cellulose is shown in Table I. It was observed that Mn supplements to the medium decreased cellulolytic activity on bacterial cellulose at all the levels tried. Growth on the cellulose discs was not altered at 10 ppm. Mn but at the other three higher concentrations it decreased from 14—16 % as when compared to the control. Decomposition of filter paper increased slightly with the addition of 5 ppm. Mn but on the whole was not affected markedly by the Mn supplements. Addition of Zn brought about a marked reduction in percentage growth and decomposition in the case of bacterial cellulose but increased cellulolytic activity on filter paper, in the latter decomposition increased by 15 % over the control in presence of 25 ppm. Zn supplement in the medium. Boron at 10 ppm. level did not influence cellulolytic activity on either bacterial or filter paper cellulose but in the presence of 25 ppm. B in the substrate decomposition of the former cellulosic material increased by 12 % and that of the latter by 7 %. Higher levels, 50 and 100 ppm., of this element decreased cellulolytic activity on both substrates, being more marked in the case of bacterial cellulose.

Table I

Influence of trace element supplements on decomposition of filter paper and bacterial cellulose by *F. culmorum*

Trace element concentration	Percentage growth/ decomposition on bacterial cellulose			Percentage decomposition of filter paper		
	Mn	Zn	B	Mn	Zn	B
10 ppm.	64/34	50/28	60/39	34	40	33
25 ppm.	50/31	50/23	74/52	41	50	42
50 ppm.	50/31	39/23	39/19	33	44	30
100 ppm.	48/21	36/23	21/14	30	43	27
Control	64/40			35		

Nitrogen source and cellulolytic activity: Influence of N source on decomposition of bacterial and filter paper cellulose was studied and the results are presented in Fig. 4. Different sources of nitrogen, namely ammonium sulphate, ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium oxalate, ammonium tartrate, sodium nitrate and urea were employed in lieu of potassium nitrate in the basal medium, maintaining N level in the substrate equivalent to that obtained with 5 g./l. KNO_3, i. e., at 0.693 gram per cent nitrogen. It was observed that nitrate nitrogen was superior to ammoniacal nitrogen for growth and cellulolytic activity of *F. culmorum*. Maximum growth/decomposition occurred when KNO_3 was supplied as the N source. Figures for decomposition obtained with $NaNO_3$ were comparable to that achieved with KNO_3. However, ammonium nitrate produced very little growth and decomposition on bacterial and filter paper cellulose substrates. The values for growth/decomposition obtained with ammonium oxalate and ammonium tartrate were identical with those achieved with ammonium nitrate. Degradation of filter paper was less than 10% in medium containing ammonium sulphate and ammonium chloride

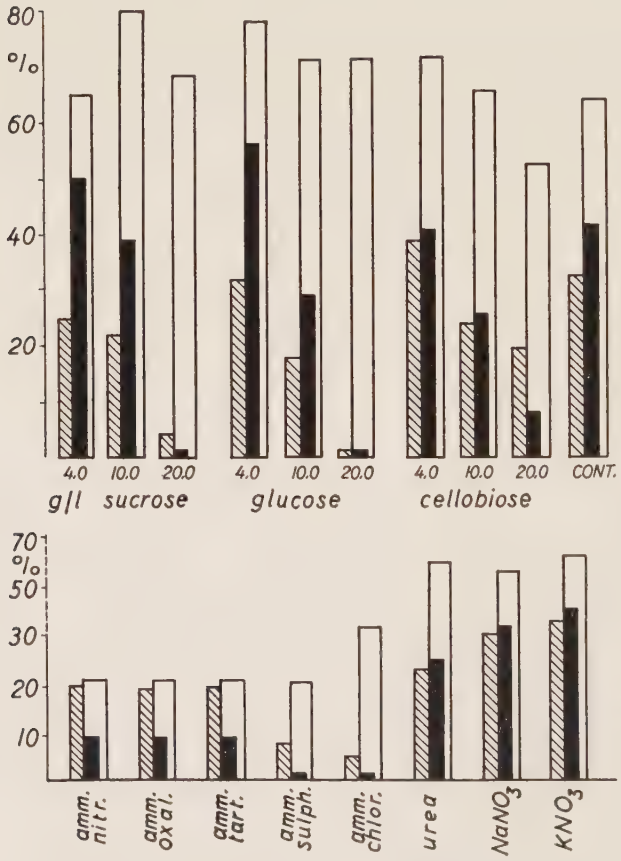


Fig. 4. Effect of carbohydrate supplements in the substrate and of various sources of nitrogen (level of N maintained at 0.0693 gram per cent) on decomposition of bacterial and filter paper cellulose by *Fusarium culmorum*. (Empty histograms represent growth and filled ones decomposition on bacterial cellulose, diagonally striped histograms indicate degradation of filter paper.) Abscissa: g/l substances. Ordinates: percentage growth/decomposition

as N sources. These two salts when supplied to bacterial cellulose completely inhibited cellulolytic activity but not growth of *F. culmorum*. Urea was superior to all the ammonium compounds tested in promoting growth and cellulolytic activity on bacterial and filter paper cellulose but was not equal to either KNO_3 or $NaNO_3$.

Influence of carbohydrate supplements on cellulolytic activity: Sucrose, glucose and cellobiose supplements in the basal medium were tested at 4, 10 and 20 grams per litre for their effect on cellulolytic activity of *F. culmorum* and the results are shown in Fig. 4. Sucrose and glucose at 4 g./l. increased decomposition of bacterial cellulose by 10 and 16 per cent, respectively, over the control but reduced cellulolytic activity on filter paper. On the other hand, addition of cellobiose at this concentration brought about a slight diminution in cellulolytic activity on bacterial cellulose, whilst increasing the rate of decomposition of filter paper. At 10 g./l. concentration only sucrose did not alter cellulolytic activity on the bacterial membranes, whereas the other two sugars reduced percentage decomposition of both substrates. No cellulolytic activity was noticed on bacterial cellulose in the presence of sucrose and glucose at the concentration of 20 g./l. in the basal medium and only 7 % decomposition was recorded on this substrate at this level of cellobiose. Decomposition of filter paper in the presence of 20 g./l. sucrose, glucose and cellobiose was 4, 0 and 20 per cent, respectively.

Discussion

Investigations were carried out on the nutritional factors influencing cellulolytic activity of *Fusarium culmorum* on bacterial and filter paper cellulose. From the figures obtained (Fig. 2—4) it was obvious that decomposition of bacterial cellulose by *F. culmorum* was more sensitive to pH and nutrient status in the substrate than filter paper. Altering the concentration of nitrogen, potassium and magnesium in the substrate resulted in wider fluctuations in percentage decomposition of bacterial cellulose when compared to filter paper (Fig. 2). Nonetheless, optima for decomposition of filter paper as well as bacterial cellulose were at the same level of pH (Fig. 3) and N, P, K and Mg concentration (Fig. 2) in the substrate. Thus it appeared that the physical and nutritional optima for cellulolytic activity were correlated with the intrinsic nature of the fungus itself and did not alter on different cellulosic materials. No cellulolytic activity was detected on the bacterial membranes when nitrogen and phosphorus were omitted from the media. However, in potassium and magnesium deficient substrates decomposition of bacterial cellulose to the extent of 14 and 5 per cent, respectively, was observed. This is attributed to traces of K and Mg carried over in the fungal inoculum. Very small concentrations of these two elements added to the substrate gave maximum degradation of cellulose (Fig. 2). The important point, however,

was that the addition of Mg to the substrate brought about marked increase in percentage decomposition of cellulose, in light of the results obtained by previous workers who have stated that this element stimulates growth but not cellulolytic activity of fungi. SINDEN *et al.*, (1948) observed that cellulolytic activity of *Myrothecium verrucaria, Curvularia lunata* and *Aspergillus flavipes* on strips of cloth did not increase with the addition of Mg to the substrate and was not altered at higher levels of the element, namely 0.060 and 0.073 grams per litre. These authors have, however, pointed out that the cellulosic material employed by them itself contained small amounts of the element; obviously this concentration was optimal for cellulose decomposition. That Mg as a macronutrient was not only essential for cellulolytic activity of *F. culmorum* but inhibited decomposition at supraoptimal levels was evident from the results obtained here (Fig. 1. D & 2). It may be emphasized that the bacterial membranes employed in the present investigation comprised pure cellulose which were free from impurities. Fungal decomposition of these was very sensitive to nutritional changes in the substrate and, therefore, accurate results could be achieved.

Very low concentrations of potassium were required for the optimal level of cellulose decomposition (Fig. 2) and at concentrations above 0.105 gram per cent cellulolytic activity was suppressed. Optimal level of phosphorus in the media was 0.877 g./l. for degradation of filter paper and bacterial cellulose. The optima in P level for breakdown of cellulose have been shown to vary with different fungi. SINDEN et al., (1948) found 1 g./l. P necessary for maximum breakdown of strips of cloth by *M. verrucaria*, whereas 3 g./l. were required in the case of *C. lunata* and *A. flavipes*. They further observed that 0.02 g. nitrogen per litre in the medium caused nearly maximum breakdown of cloth strips by *M. verrucaria* and *C. lunata* and 0.06 g./l. by *A. flavipes*. However, all the three fungi were capable of decomposing cellulose from 8—25 % even when no nitrogen was added to the substrate, probably due to the fact that the cloth strips contained nitrogen initially. In the present investigation no cellulolytic activity was perceptible in the substrate in the absence of N from the media (Fig. 2). Maximum degradation of both bacterial membranes as well as filter paper was achieved in the presence of 0.66 g. nitrogen per litre (4 g./l. Na NO_3); higher concentrations being found to suppress cellulose decomposition (Fig. 1 E). The preference for source of nitrogen, among the various investigated, was for nitrate nitrogen (Fig. 4). Potassium nitrate and sodium nitrate, in the order mentioned, were superior to urea, ammonium sulphate, ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium tartrate and ammonium oxalate. No cellulolytic activity was detected on bacterial membranes supplied with 0.693 g./l. N as ammonium sulphate and ammonium chloride, and only 10 % decomposition resulted in substrates containing this level of nitrogen as ammonium oxalate, ammonium tartrate and ammonium nitrate. The preference for nitrogen source differs with different cellulolytic fungi. REESE, employing sodium nitrate, ammonium

sulphate, urea and peptone, found maximum cellulose digestion by *Humicola grisea* occurring with peptone and in the case of *Aspergillus fumigatus* with ammonium sulphate (cited, Siu, 1951). However, another isolate of *A. fumigatus* employed by Basu (1948) produced maximum decomposition of cellulose with peptone as the source of nitrogen when compared to ammonium sulphate and sodium nitrate. Greathouse and Ames (1945) demonstrated differences in respect to preference for sources of nitrogen in 16 species of *Chaetomium*. Rate of cellulose breakdown for *M. verrucaria* with a ratio of 1 ammonium to 24 nitrate ions was approximately three times that when the nitrogen was present completely as the ammonium form, whereas with *C. lunata* little difference was noted (Sinden et al., 1948). The strongly cellulolytic *Trichoderma köningi (T. viride)* was found to produce maximum decomposition of cellulose in the presence of 1 % ammonium sulphate and ammonium nitrate (Ishimatsu and Toyama, 1952). It has been shown by Pai (1956) that certain isolates of *F. vasinfectum* were 'nitrophilic', whereas others were 'ammoniophilic'. From the results obtained here *F. culmorum* falls into the category of 'nitrophilic' fungi.

The pH optima for cellulolytic fungi have been found to vary widely between species, ranging from pH 4.2 to 7.0 (Siu, 1951). For the strongly cellulolytic *A. flavipes*, *C. lunata* and *M. verrucaria* pH optima fell within the range of 6—7 (Siu and Sinden, 1951) and for *T. köningi* (*T. viride)* it was 6.0 (Ishimatsu and Toyama, 1952). Previous investigations by the author revealed that the activity of the enzyme preparation of most species of Fusaria was maximum at pH 5.5 whilst some had an optima of pH 6.5 (Venkata Ram, 1956). *F. culmorum* caused maximum breakdown of both bacterial and filter paper cellulose at pH 5.0 (Fig. 1 F & 3). However, the tolerable pH range for cellulolytic activity was much narrower in the case of bacterial cellulose than filter paper.

Inasmuch as partial inhibition of cellulolytic activity by added sugars is regarded to be due to preferential utilization of the simple carbon compounds by the organism (Siu, 1951), it was of interest that sucrose and glucose supplements in the medium at 0.4 gram per cent increased cellulolytic activity of *F. culmorum* on bacterial cellulose, though not on filter paper (Fig. 4). Opposite was the case with cellobiose. At 1.0 g. per cent concentration, glucose and cellobiose were more inhibitory to decomposition of bacterial membranes than sucrose while at 2 % level both sucrose and glucose completely inhibited cellulolytic activity, whereas cellobiose did not (Fig. 1. A—C). The explanation for the acceleration in cellulose degradation brought about by the addition of 0.4 gram per cent sucrose and glucose to the substrate is not clear although such instances have been recorded in the past (Siu, 1951). However, it is logical to assume that the addition of these sugars, at low concentrations, provided a faster fungal growth rate in the initial phase during which the sugar was completely utilized and increase in decomposition of the substrate was perhaps due to the vigorous growth of the fungus achie-

ved. Despite the fact that vigorously growing fungal colony normally manifested high degree of cellulolytic activity, the rate of cellulose breakdown was not necessarily a function of the intensity of mycelial growth. This was obvious from the figures obtained for percentage growth/cellulolytic activity on bacterial cellulose containing different concentrations of K, Mg and P (Fig. 2), when different sources of nitrogen were employed (Fig. 4) and at various pH levels (Fig. 3). Thus, when percentage growth obtained at pH 4.0 to 8.0 varied within a narrow limit of 56—64 %, cellulose decomposition ranged between 21 and 50 per cent (Fig. 3). Increase in growth rate on bacterial cellulose did not always result in increase in percentage decomposition, which sometimes decreased and v i c e v e r s a (Fig. 2). The relationship between rate of growth and cellulose decomposition by the fungus was elegantly brought out by the present technique, employing bacterial cellulose membranes. *F. culmorum* failed to make any growth only when N was omitted from the media but not in the absence of K, Mg and P (Fig. 2), wherein 30—40 % growth was measured. But little or no cellulolytic activity was detected when P and Mg were absent in the substrate. It was clear that the level of macronutrients required for initiating cellulolytic processes by the fungus was much higher than what was necessary for supporting vegetative growth. It is in this that the present contribution marks a definite advance in studies on cellulolytic fungi.

Summary

The technique of employing bacterial cellulose discs as substrate was further developed for investigating the influence of pH and nutritional factors on cellulolytic activity of *Fusarium culmorum*. This technique in addition to being simple, sensitive and accurate, has the advantage of simultaneously yielding quantitative data on growth and cellulose decomposition. Valuable information was obtained on the relationship between fungal growth rate and cellulolytic activity as influenced by physical and nutritional factors. Increase in growth rate did not always result in increase in cellulose decomposition which sometimes decreased and v i c e v e r s a.

Optima for decomposition of filter paper and bacterial cellulose were at the same level of pH (5.0) and N, P, K and Mg concentration in the substrate. The addition of N to bacterial cellulose was found essential for initiating growth as well as cellulolytic activity, that of P for cellulose decomposition but not growth, whereas both growth/decomposition were perceptible when K and Mg were omitted in the media. Nevertheless, addition of K and Mg at 0.105 and 0.0079 gram per cent, respectively, gave three-fold increase in cellulolytic activity over that achieved when these two elements were absent. The level of macronutrients required for initiating cellulolytic processes by the fungus was much higher than what was necessary for supporting

vegetative growth. Nitrate nitrogen was superior to ammoniacal nitrogen and urea for growth/decomposition on either substrate. Zinc at optimal concentration markedly stimulated cellulolytic activity on filter paper but not on bacterial cellulose, whereas reverse was the case with boron. Concentration of sucrose and glucose at 0.4 gram per cent increased decomposition of bacterial cellulose but not filter paper; opposite was the case with cellobiose. Higher concentration of the three sugars inhibited cellulolytic activity on both substrates.

Zusammenfassung

Zur Untersuchung des Abbaues von Zellulose durch *Fusarium culmorum* wurden Zellulosemembranen (hergestellt aus *Acetobacter xylinium)* und Filterpapier verwendet. Eine Methode zur Messung des Pilzwachstums und des Zelluloseabbaues wird beschrieben.

Es kann keine direkte Beziehung zwischen Wachstum und Zelluloseabbau festgestellt werden. Bei beiden Substraten erfolgte optimaler Zelluloseabbau bei pH 5,0 und gleichen Konzentrationen von N, P, K und Mg, währenddem für das Wachstum geringere Konzentrationen dieser Stoffe benötigt werden. Als N-Quelle sind Nitrate den Ammoniumsalzen und dem Harnstoff überlegen. Zink und Bor haben bei den beiden Substraten verschiedenen Einfluß, ebenso Saccharose, Glukose und Zellobiose. In höheren Konzentrationen dieser Zucker war der Zelluloseabbau gehemmt.

Acknowledgements

The author is grateful to Prof. T. S. Sadasivan for his criticism and interest in this work. He thanks the Government of India for the award of a National Research Fellowship during the tenure of which this investigation was carried out and the University of Madras for facilities for work.

References

Basu, S. N., 1948: Fungal decomposition of jute fibre and cellulose. J. Text. Inst. 39, T 233—T 248.

Greathouse, G. A., and L. M. Ames, 1945: Fabric deterioration by thirteen described and three new species of *Chaetomium.* Mycologia 37, 138—155.

Ishimatsu, Y., and N. Toyama, 1952: Cellulose decomposition by *Trichoderma köningi.* J. Ferm. Technol. 30, 409—414. (Chem. Abstr. 47, 5679, 1953.)

Pai, K. V. Srinivasa, 1956: Some aspects of nitrogen utilization by soil fungi. Doctoral Thesis, Madras Univ.

Sinden, J. W., A. J. Mix and R. G. H. Siu, 1948: Microbiological Series Report No. 8. Philadelphia. U. S. Army Quartermaster General Laboratories (cited R. G. H. Siu, 1951: Microbial decomposition of cellulose. New York. Reinhold Publishing Corpn.).

Siu, R. G. H., 1951: Microbial decomposition of cellulose. New York. Reinhold Publishing Corpn.

— —, and J. W. Sinden, 1951: Effects of pH, temperature and mineral nutrition on cellulolytic fungi. Amer. J. Bot. **38**, 284—290.

— —, and E. T. Reese, 1953: Decomposition of cellulose by microorganisms. Bot. Rev. **19**, 377—416.

Venkata Ram, C. S., 1956: Studies on cellulolytic activity of Fusaria with reference to bacterial and other cellulose substrates. Proc. nat. Inst. Sci. India **22 B**, 204—211.

Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. H. Braun

Über sortenbedingte Anfälligkeit der Kartoffelknolle für *Fusarium caeruleum* (Lib.) Sacc. und *Phoma foveata* Foister und ihre Beeinflussung durch den Anbauort

Von

J. Kranz

Mit 9 Abbildungen

A. Einleitung

Für ausländische Kartoffelsorten ist in den letzten Jahren mehrfach nachgewiesen worden, daß sie für *Fusarium caeruleum* (Foister 1940, Lansade 1950, Mooi 1950, Boyd 1952 a und b, Ayers 1956) und *Phoma foveata* (Alcock und Foister 1936, Foister 1940, 1952) unterschiedlich anfällig sind. Über die Anfälligkeit des gegenwärtigen westdeutschen Kartoffelsortiments fehlen solche Angaben mit Ausnahme eines Hinweises für *Phoma foveata* (Braun und Voss 1954). Es lag deshalb nahe, dieser Frage nachzugehen. Dafür wurden neunzehn, in der Anerkennungsfläche ihrer Reifegruppen zumeist führende Sorten (siehe Schliemann 1957) ausgewählt. Von vier von ihnen standen je vier bis fünf Herkünfte zur Verfügung, an denen geprüft werden konnte, ob die Aufwuchsbedingungen die Anfälligkeit der Knolle beeinflussen.

Alle Ergebnisse beziehen sich auf die „physiologische" Anfälligkeit. Unter ihr versteht Boyd (1952 b) die Anfälligkeit des Knollenfleisches, während bei der „mechanischen" Anfälligkeit noch die Empfindlichkeit für Verletzungen berücksichtigt wird. Zwischen beiden besteht meist enge Übereinstimmung, die sich für *F. caeruleum* zudem weitgehend mit dem natürlichen Befall deckt (Boyd 1952 b, Ayers 1956).

Die Infektionen wurden von Anfang November bis Anfang Dezember vorgenommen, einmal, weil nach der Ernte die Infektionsdisposition für beide Parasiten mit Reife und Alter der Knollen zunimmt (Lansade 1950, Mooi 1950, Boyd 1952 a, Foister 1940, Kranz 1958). Gegenüber der *Fusarium*-Fäule gleichen sich anfängliche Unterschiede in der Sortenanfälligkeit mehr und mehr aus, so daß sich im Frühjahr nur noch sehr widerstandsfähige Sorten deutlich herausheben (Boyd 1952 b). Foister, Wilson und Boyd (1952)

haben ferner nachgewiesen, daß die *Fusarium*-Fäule vornehmlich als Folge von Verletzungen beim Sortieren vor Verladen oder Einlagern — also im Herbst — auftritt, was auch für die *Phoma*-Fäule zutreffen dürfte (KRANZ 1958). In gleichem Sinne wirken Transportschäden (FOISTER 1952), die gerade in den Monaten September bis November beträchtlich sein können, in denen etwas mehr als 50 % des gesamten jährlichen Kartoffelumschlages durch die Bundesbahn bewältigt werden[1]). Um die mit beiden Pilzen erzielten Ergebnisse vergleichbar zu machen, war zu bedenken, daß die Knollen für *P. foveata* erst ab Ende Oktober erheblich anfällig werden. Deshalb mußten die Infektionen auf den genannten Zeitraum verlegt werden, den auch BOYD (1952 b) für *F. caeruleum* empfiehlt. Andererseits sollte ihre Begrenzung auf einen möglichst kurzen Zeitraum die Auswirkung eines Anstiegs der Anfälligkeit auf die Streuung der Einzelwerte mildern.

B. Infektionsmaterial und -methode

Die Sporen wurden von einer *Fusarium caeruleum*-Kultur[2]) und einer schon früher verwendeten Isolierung von *P. foveata* (KRANZ 1958) gewonnen. Beide Pilze wuchsen drei bis vier Wochen bei Zimmertemperatur und diffusem Licht heran, *F. caeruleum* auf 40 %-Bierwürze-Agar, *P. foveata* auf 2 %-Biomalz-Agar. Die Dichte der Sporensuspension betrug etwa 500 000 bis 1 000 000 Sporen/cm³, die Keimfähigkeit mehr als 75 %.

In die gewaschenen und sterilisierten Knollen wurden mit einer Stanze einseitig je 6 Löcher von 6 mm Tiefe und 3 mm Weite eingedrückt. Der Einstich reichte bis in das Parenchym der Knollen. In den Grund der Wunde brachte ich mit einer verlängerten Injektionsspritze die Sporensuspension ein, um so die Luft vollständig herauszudrücken.

An jedem der vier Infektionstermine wurden je Sorte und Herkunft fünf Knollen (N = 30) infiziert. Die infizierten Knollen lagerten anschließend bei 4 °C (*P. foveata*) bzw. 16 °C (*F. caeruleum*) und hoher Luftfeuchtigkeit in sterilisierten und verschlossenen, täglich gelüfteten Kästen. Die Befallshäufigkeit bei Versuchsende (Anzahl der Erkrankungen von 30 Infektionen) ist in %-Werten angegeben, die für die varianzanalytische Auswertung nach BLISS (SNEDECOR 1946, SS 447 und 449) transformiert sind. Beendet wurden die Versuche jeweils nach 28 (*F. caeruleum*) bzw. 42 Tagen (*P. foveata*).

Folgende Zeichen wurden verwendet:

N	=	Anzahl der Einzelwerte.
$\bar{x}$ (%)	=	Arithmetisches Mittel aus Prozentwerten,
$\bar{x}$ (tr)	=	Arithmetisches Mittel aus Prozentwerten, nach arcus—sinus Transformation (nach BLISS).
GD	=	Kleinste signifikante Differenz für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit (P) von 5 %, 1 % und 0,1 %.
t, F und χ^2	=	Faktoren zur Bestimmung der Überschreitungswahrscheinlichkeit (P).
r	=	Rangkorrelationskoeffizient.
V	=	Variationsbreite.

Die Differenzen mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von

$P > 5$ %	gelten als nicht gesichert	(°)
$P < 5$ %	gelten als schwach gesichert	(*)
$P < 1$ %	gelten als gesichert	(**)
$P < 0{,}1$ %	gelten als gut gesichert	(***)

[1]) Nach den Angaben des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten für die Jahre 1951 bis 1957.

[2]) Für die Übersendung danke ich Mr. MCKEE bestens.

C. Ergebnisse

I. INFEKTIONSDISPOSITION DER KARTOFFELKNOLLE FÜR *FUSARIUM CAERULEUM* UND *PHOMA FOVEATA* IN ABHÄNGIGKEIT VON SORTE UND REIFEGRUPPE

Die Symptome beider Fäulen waren im Anfangsstadium und bei weniger anfälligen Sorten einander sehr ähnlich. Sie ließen sich weder äußerlich noch im Schnitt sicher voneinander unterscheiden (Abb. 1, 2 und 3). Bei anfälligeren Sorten verwandelte *F. caeruleum* später die ganze Knolle in eine gelbliche, weiche, schwach riechende Fäule (Abb. 4 und 5), auf der sich Sporodochien entwickelten (Abb. 4). Die *Phoma*-Fäule blieb dagegen stets auf Dellen beschränkt (Abb. 6 und 7), auf denen sich im Dunkeln nur selten Pyknidien bildeten. Aber auch bei ihr sind gelbliche „toxische" Zonen beobachtet worden (KRANZ 1958). Andererseits ist eine braune Randbegrenzung, wie sie FOISTER (1940) angibt, nicht nur bei der *Phoma*-Fäule zu finden. Sie konnte deshalb leicht mit einer *Fusarium*-Fäule einer weniger anfälligen Sorte verwechselt werden.

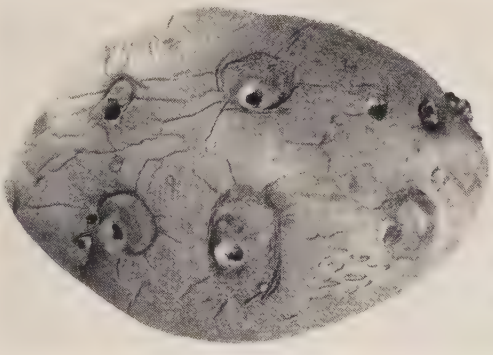


Abb. 1. *Fusarium*-Fäule (zehn Wochen bei 16 °C)

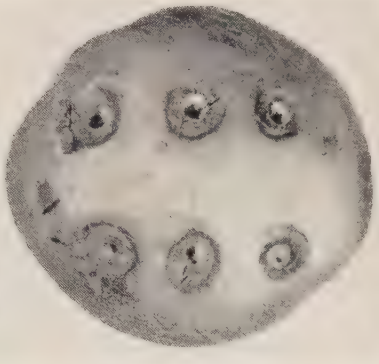


Abb. 2. *Phoma*-Fäule (zehn Wochen bei 4 °C)

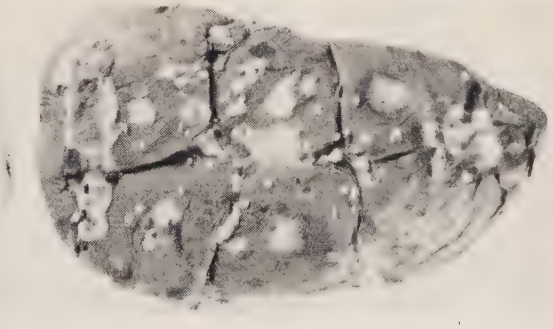


Abb. 3 (links). Schnittbild der *Fusarium*- und *Phoma*-Fäule bei Sorten geringer Anfälligkeit (hier *Fusarium*-Fäule)

Abb. 4 (rechts). Fortgeschrittene *Fusarium*-Fäule (zehn Wochen bei 16 °C)

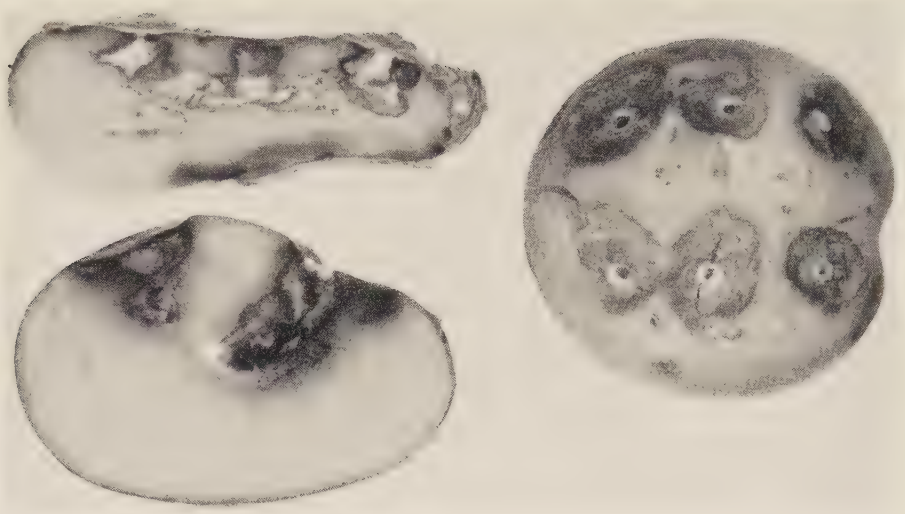


Abb. 5 (oben links). Fortgeschrittene *Fusarium*-Fäule; Knolle aus Abbildung 4 im Schnitt
Abb. 6 (rechts). *Phoma*-Fäule (zehn Wochen bei 4 °C)
Abb. 7 (unten links). *Phoma*-Fäule im Schnitt (zehn Wochen bei 4 °C)

1. Sortenanfälligkeit

Die in Tabelle 1 aufgeführten Kartoffelsorten der Reifegruppen „Sehr frühreifend" („Vorkeimsorten"), „Frühreifend", „Mittelfrühreifend" und „Mittelspät bis Spätreifend" wurden 1957 als Hochzucht auf dem Versuchsfeld des Institutes angebaut. Der schwach saure, sandige Lehmboden war in üblicher Weise mit 80 kg/ha N (schwefelsaures Ammoniak), 75 kg/ha P_2O_5 (Thomasmehl) und 90 kg/ha K_2O (Kalimagnesia) gedüngt worden. Der Bestand entwickelte sich normal. Die Knollen wurden Anfang September geerntet, auf mittelgroße Knollen (40 bis 60 g) sortiert und sofort bei 5 °C bis zu den Infektionen am 5. November, 6. November, 27. November bzw. 5. Dezember gelagert. Der erzielte Befall mit *F. caeruleum* und *P. foveata* ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Alle neunzehn Sorten waren von beiden Pilzen befallen, wenn auch unterschiedlich stark, wie die aus den vier Wiederholungen gemittelten Befallsprozente (Tab. 1, Spalte 7 und 12) erkennen lassen. Für *F. caeruleum* hat BOYD (1952 b) dasselbe berichtet. LANSADE (1950) und AYERS (1956) fanden dagegen einige Sorten und Zuchtstämme, die zeitweilig nicht befallen wurden (Saucisse, Rosa und Primula; F 4768 und F 4412).

Die Anfälligkeit für *F. caeruleum* umfaßt eine größere Befallsspanne (11,7 bis 90,8 %) als die für *P. foevata* (13,3 bis 65,8 %). Erstere verteilt sich ziemlich gleichmäßig über die ganze Breite, bei letzterer liegen 17 Sorten zwischen 31 und 65 %. Dementsprechend sind die Unterschiede zwischen den Befallswerten für *F. caeruleum* im F-Test mit 7,16*** gut, für *P. foevata* mit F = 1,42° nicht gesichert. Die Signifikanzen für die Sortenunterschiede gegen-

Tabelle 1

Die Infektionsdisposition

von 19 Kartoffelsorten für *Fusarium caeruleum* und *Phoma foveata*

Nr.	Sorte	*Fusarium caeruleum*					*Phoma foveata*					Rangfolge d. Anfälligkeiten	
		Befall in % aus 30 Inf. am				$\bar{x}$ (%)	Befall in % aus 30 Inf. am				$\bar{x}$ (%)	*F. caeruleum*	*P. foveata*
		5.11.	6.11.	27.11.	5.12.		5.11.	6.11.	27.11.	5.12.			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Holl. Erstling	50	33	27	23	33,3	23	13	43	100	45,0	12	11
2	Oberarnb. Fr.	60	63	13	70	51,7	7	30	83	97	54,2	9	7
3	Saskia	77	53	57	93	70,0	7	23	60	100	47,5	5	10
4	Sirtema	87	93	67	97	85,8	30	23	90	100	60,8	2	5
5	Vera	30	17	53	57	39,2	3	17	83	97	50,0	11	8
6	Sieglinde	97	97	70	100	90,8	37	37	87	100	65,0	1	2
7	Corona	17	17	17	10	15,0	27	33	87	100	61,7	16	4
8	Frühperle	43	30	0	30	25,8	10	0	17	97	30,8	15	17
9	Sommerkrone	100	90	47	93	81,5	17	17	27	90	37,5	3	14
10	Augusta	77	57	53	57	60,8	0	7	70	100	44,2	7	12
11	Bona	27	40	53	93	53,3	37	30	87	100	63,3	8	3
12	Lori	67	33	43	37	45,0	3	13	17	100	33,3	10	15
13	Olympia	7	27	7	7	11,7	13	13	37	100	40,8	18	13
14	Jakobi	13	27	17	47	25,8	33	30	70	100	58,3	14	6
15	Ackersegen	23	7	7	17	13,3	27	17	53	100	49,2	17	9
16	Maritta	0	0	30	17	11,7	0	3	7	67	19,2	19	18
17	Heida	7	27	13	77	31,0	33	40	90	100	65,8	13	1
18	Carmen	70	63	27	97	64,2	3	3	40	83	32,5	6	16
19	Capella	80	97	50	93	80,0	0	3	7	43	13,3	4	19
		F = 7,16***				46,9	F = 1,42°				45,9	r = 0,07	

über *F. caeruleum* in der varianzanalytischen Verrechnung ließen sich daher im q-Test (Pearson und Hartley 1956, S. 51, Tab. S. 176) nach der Formel

$$GD = q(k/n_R) \sqrt{\frac{S^2_R}{N_k}}$$ prüfen (Tab. 2).

k = Anzahl der Gruppen,
n_R = Anzahl der Freiheitsgrade der Restvarianz,
N_k = Anzahl der Gruppeneinzelwerte,
S^2_R = Streuung innerhalb der Gruppen.

Zwischen den Sorten, die auf der linken oder oberen Leiste der Tabelle 2 fehlen (vgl. Tab. 1), gibt es keine Sicherungen.

Andererseits erhält man auch für den *Phoma*-Befall eindeutige Sicherungen über den Rechnungsgang einer $m \times n$ Tafel — 4 Wiederholungen × 19 Sorten — (χ^2 = 549,5***): Dabei fallen insbesondere die wenig anfälligen Sorten Capella und Maritta heraus. Zwischen ihnen und einem Teil der übrigen Sorten

Tabelle 2

q-Test auf Signifikanz in der Anfälligkeit zwischen den Sorten (mit den nach arc.-sin. $\sqrt{x}$ transformierten mittleren Befallsprozenten) für *Fusarium caeruleum*

Sorte Nr.		16	13	15	7	8	14	17	1	5
	$\bar{x}_{(tr)}$	14,33	19,02	20,74	22,70	26,86	29,93	32,16	35,05	38,26
6	76,46	62,13**	57,44**	55,72**	53,76**	49,60**	46,53**	44,30**	41,41*	38,20*
4	71,98	57,65**	52,96**	51,24**	49,28**	45,12**	42,05**	39,82*	36,93*	33,72°
9	69,91	55,58**	50,89**	49,17**	47,21**	43,05**	39,05*	37,75*	34,86°	
19	65,74	51,41**	46,72**	45,00**	43,04**	38,88*	35,81°	33,58°		
3	57,97	43,64**	38,95**	37,23*	35,27°	31,11°				
18	55,03	40,70*	36,01°	34,29°						
10	51,43	37,10*								
11	48,05	33,72°								

dürften echte Unterschiede vorliegen, die in der Varianzanalyse durch eine extrem große Streuung überlagert werden. Ursache dieser Streuung (Tab. 1, Spalten 8 bis 11) ist die starke Zunahme der Infektionsdisposition aller Sorten in der Zeit vom 5. November bis 5. Dezember, die frühere Ergebnisse bestätigt (KRANZ 1958). Während Anfang November erhebliche Unterschiede bestehen und manche Sorten überhaupt noch nicht anfällig sind, haben sie 4 Wochen später einen hohen Grad der Anfälligkeit erreicht; nur die Spätsorten Capella, Maritta und Carmen machen davon eine Ausnahme. Für *F. caeruleum* werden die Sorten im gleichen Zeitraum im Durchschnitt nur wenig anfälliger, wenn man von Bona, Heida und Maritta absieht. Der hohe *Phoma*-Befall aus der Infektion vom 5. Dezember scheint durch eine sehr hohe Aggressivität des Pilzes bedingt zu sein (vgl. Infektion v. 10. 12. in Tab. 5).

In der Rangfolge ihrer Anfälligkeit für *F. caeruleum* und *P. foveata* stimmen die Sorten nicht überein; der Rangkorrelationskoeffizient $r = 0{,}07$ ist praktisch Null. Ähnlich unterschiedlich verhalten sich amerikanische Sorten gegenüber *F. caeruleum* und *F. sambucinum* f. 6 (AYERS 1956). Nur Sieglinde ist sowohl für *F. caeruleum* als auch für *P. foveata* hoch anfällig (1. bzw. 2. Rang), während Maritta (19. bzw. 18. Rang) und Frühperle (15. bzw. 17. Rang) gegenüber beiden widerstandsfähig sind.

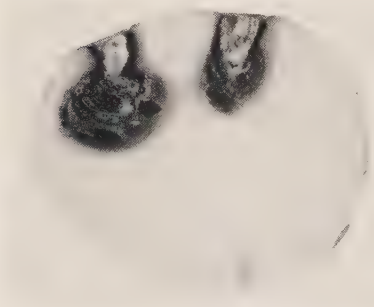


Abb. 8. „Verdeckte" *Phoma*-Fäule an der Sorte Bona (nach zehn Wochen)

Bei den Infektionsreihen vom 5. und 6. November fiel die *Phoma*-Fäule durch eine Besonderheit auf, die bei der *Fusarium*-Fäule fast völlig fehlte: Bei Schnitten durch die Infektionsstellen waren bei einem Teil von ihnen äußerlich nicht sichtbare „verdeckte" Fäulen festzustellen (Abb. 8), deren Zahl von Sorte zu Sorte erheblich schwankte (Tab. 3).

Tabelle 3
„Verdeckte" *Phoma*-Fäulen in Abhängigkeit von der Sorte

Sorte	Zahl der Infektionsstellen	sichtbare Fäulen	verdeckte Fäulen	nicht erkrankt
Holl. Erstling	30	4	2	24
Saskia	30	7	3	20
Sirtema	30	7	9	14
Vera	30	5	25	0
Sieglinde	30	11	12	7
Corona	30	10	19	1
Sommerkrone	30	5	14	11
Bona	30	9	13	8
Lori	30	4	8	18
Olympia	30	4	5	21
Jakobi	30	9	4	17
Ackersegen	30	5	12	13
Maritta	30	1	3	26
Heida	30	12	13	5
Carmen	30	1	14	15
Capella	30	1	4	25

Besonders hoch ist ihr Anteil bei Vera, Corona, Carmen, Sommerkrone, Bona, Heida, Sieglinde und Ackersegen. Nach dem äußeren Bild müßten Vera, Carmen, Sommerkrone und Ackersegen als mehr oder weniger schwach, nach dem Schnittbild jedoch als hoch anfällig gelten. Die vier anderen Sorten zeigen diesen Gegensatz nicht. Wie bei *Alternaria porri* f. sp. *solani* (Middendorf und Kranz 1959) entwickeln sich Infektionen durch *P. foveata* demnach offenbar im Parenchym besser als in der Rinde, während Sporen von *F. caeruleum* dort anscheinend ohne Schwierigkeiten Fäulen auslösen können. Bei den Infektionen am 25. November und 5. Dezember waren derartige „verdeckte" *Phoma*-Fäulen viel seltener. Es scheint demnach, als ob die Resistenz der Knolle gegenüber *P. foveata* Anfang November vornehmlich in der Rinde lokalisiert sei und dann verlorenginge, so daß der Pilz später — ebenso wie *F. caeruleum* — unschwer auch in der Rinde haftet und sich dort ausbreiten kann. Möglicherweise ist eine solche Resistenzänderung gegenüber *F. caeruleum* schon früher eingetreten. Elarosi (1957) fand bei jungen Knollen, daß das Parenchym mit *Fusarium solani* leichter zu infizieren war als „Gewebe nahe dem Periderm".

Bei meinen Infektionsversuchen ermittelte ich auch die mittleren Inkubationszeiten ($\bar{x}$) beider Fäulen. Soweit bei Versuchsende mehr als 8 von 30 Infektionen angegangen waren, stellte ich fest, wann bei den jeden zweiten Tag vorgenommenen Bonituren 50 % aller bei Versuchsende sichtbaren Erkrankungen erkennbar waren. Diese Zentralwerte wurden addiert und durch die Zahl der Sorten dividiert. Dabei ergab sich als mittlere

Inkubationszeit Anfang November (6. 11.) für die *Fusarium*-Fäule $\bar{x}$ = 16,3 Tage (V = 11—22), für die *Phoma*-Fäule $\bar{x}$ = 31,7 Tage (V = 23—38). In den ersten Dezembertagen blieb sie für *Fusarium*-Fäule mit $\bar{x}$ = 16,2 Tagen (V = 12—24) unverändert, während sie für die *Phoma*-Fäule — bei gleichzeitig größerer Anfälligkeit — auf $\bar{x}$ = 18,6 Tage (V = 15—22) zurückging.

2. Infektionsdisposition und Reifegruppe

Um zu prüfen, ob eine Beziehung zwischen Infektionsdisposition und Reifegruppe besteht, wurden die 19 Sorten nach Reifegruppen geordnet (siehe unten) und deren nach BLISS transformierte Befallsprozente in einer Varianzanalyse erneut verrechnet. Die Sicherungen im t-Test (ungleiches N!) sind aus Tabelle 4 ersichtlich, in der die Reifegruppen wie folgt bezeichnet sind:

A = Vorkeimsorten = Sorten 1— 5 der Tabelle 1,
B = Frühreifende Sorten = Sorten 6— 9 der Tabelle 1,
C = Mittelfrühreifende Sorten = Sorten 10—14 der Tabelle 1,
D = Spätreifende Sorten = Sorten 15—19 der Tabelle 1.

Tabelle 4

t-Teste auf Signifikanz in der Anfälligkeit der Reifegruppen (mit den nach arc.-sin. $\sqrt{x}$ transformierten mittleren Befallsprozenten) für *Fusarium caeruleum* und *Phoma foveata*

Fusarium caeruleum

Reife-gruppen		C	D	B
	$\bar{x}_{(tr)}$	39,32	40,00	53,27
A	56,00	45,70***[1]	32,34***	2,08°
B	53,27	10,46***	2,36*	
C	40,00	0,35°		

Phoma foveata

Reife-gruppen		D	C	B
	$\bar{x}_{(tr)}$	36,00	47,98	48,75
A	51,50	60,14***	22,04***	1,62°
B	48,75	4,59***	0,38°	
C	47,98	6,59***		

[1]) t-Werte!

Die Vorkeimsorten (A) sind für beide Erreger am anfälligsten; danach folgen die frühreifenden Sorten (B). Da aber die Differenzen zwischen A und B in beiden Fällen nicht gesichert sind, ist diese Reihenfolge zufällig. Ebensowenig besteht ausreichende Signifikanz zwischen B und C (*P. foveata*) und B und D (*F. caeruleum*). Die Anfälligkeit der beiden letzten Reifegruppen (C und D) ist aber stets signifikant verschieden von den Vorkeimsorten (A). C und D unterscheiden sich ihrerseits nur gegenüber *P. foveata* wesentlich voneinander. Demnach kann angenommen werden, daß im November die Anfälligkeit für beide Pilze bei den Frühsorten (A und B) größer ist als bei mittelfrüh- bis spätreifenden. Das deckt sich mit der Angabe FOISTERS (1940), daß Spätsorten weniger von diesen beiden Erregern befallen werden. Andererseits finden sich aber auch unter den mittelfrüh- und spätreifenden Sorten vergleichsweise für den einen oder den anderen Pilz hochanfällige (Bona,

Capella, Carmen und Heida), wie es umgekehrt auch widerstandsfähige frühreifende Sorten gibt (Corona, Frühperle).

II. EINFLUSS DES ANBAUORTES AUF DIE SORTENBEDINGTE INFEKTIONSDISPOSITION DER KARTOFFELKNOLLE FÜR *F. CAERULEUM* UND *P. FOVEATA*

Die Versuche wurden mit 5 bzw. 4 Herkünften[1]) der Sorten Sieglinde, Bona, Erstling und Ackersegen durchgeführt. Die Bodenverhältnisse der Herkünfte lassen sich folgendermaßen kennzeichnen:

Bonn:	(siehe Seite 138).
Bremervörde:	Nicht abgetorftes Hochmoor in mindestens vierjähriger Kultur.
Donaueschingen:	Muschelkalkverwitterungsboden in 720 m Höhe.
Soltau:	Sand (Bodenzahl 25).
Uelzen:	Sandiger Lehm mit Lehm als Untergrund (Bodenzahl 62 bis 65).

Die Befallsprozente nach 28 (*F. caeruleum*) bzw. 42 Tagen (*P. foveata*) mit ihren Sicherungsverhältnissen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Der F-Test zeigt für den sortenunterschiedlichen Befall gegenüber jedem der beiden Parasiten gute Sicherungen, die für die Herkünfte fehlen oder nicht ausreichen. Die Unterschiede zwischen diesen sind also trotz erheblich abweichender Bodenverhältnisse nicht wesentlich größer als die Streuungen innerhalb der Herkünfte. Die Infektionsdisposition für beide Erreger ist demnach stärker durch Sorten als durch Umwelteinflüsse bestimmt. Die graphische Darstellung in Abbildung 9 spricht trotzdem dafür, daß bei Sorten ein Einfluß des Anbauortes sich geltend macht (Erstling und Ackersegen für

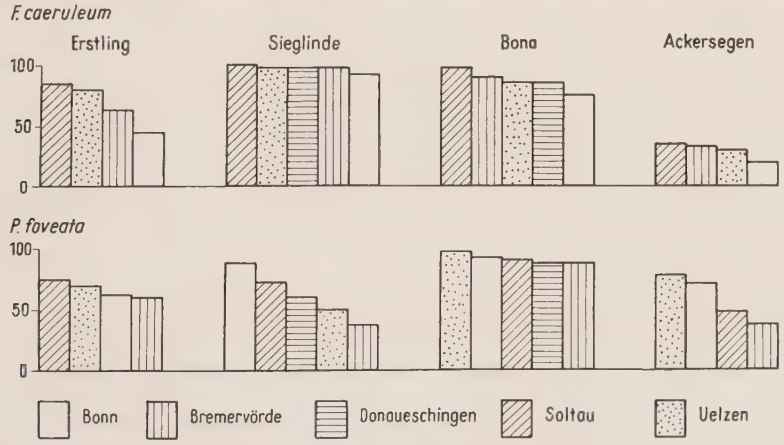


Abb. 9. Vergleich der Anfälligkeit der Sorten Erstling, Sieglinde, Bona und Ackersegen von fünf Anbauorten für *Fusarium caeruleum* und *Phoma foveata* (vgl. x% Tab. 5)

[1]) Ich danke Frau Dr. Höppner-Rethmar und den Herren OLR. Vogt-Hannover, Barth-Soltau, Dr. Pernice-Uelzen und Vieregge-Bremervörde sowie dem Saatbauamt Donaueschingen für Vermittlung des Versuchsmaterials.

Tabelle 5

Einfluß der Herkunft auf die Anfälligkeit von vier Kartoffelsorten für *Fusarium caeruleum* und *Phoma foveata*

Herkunft	Sorte	*Fusarium caeruleum*					*Phoma foveata*				
		% Erkrankungen aus 30 Infektionen am				$\bar{x}$ (%)	% Erkrankungen aus 30 Infektionen am				$\bar{x}$ (%)
		25.11	5.12	10.12	10.12		25.11	5.12	10.12	10.12	
Bonn	Erstling	26,7	23,3	70,0	63,3	45,8	43,3	100,0	63,3	46,7	63,3
	Sieglinde	70,0	100 0	100,0	100,0	92,5	86,7	100,0	80,0	90,0	89,2
	Bona	53,3	93,3	73,3	76,7	74,2	86,7	100,0	93,3	93,3	93,3
	Ackersegen	6,7	16,7	13,3	36,7	18,3	53,3	100,0	60,0	66,7	72,0
Bremervörde	Erstling	13,3	53,3	93,3	90,0	62,5	16,7	73,3	83,3	76,3	62,3
	Sieglinde	100,0	100,0	100,0	93,3	98,3	40,0	63,3	16,7	40,0	40,0
	Bona	80,0	93,3	100,0	96,7	89,2	83,3	96,7	90,0	73,3	85,8
	Ackersegen	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Donaueschingen	Erstling	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Sieglinde	96,7	100,0	100,0	100,0	99,2	60,3	76,7	30,0	70,0	60,0
	Bona	86,7	96,7	75,0	76,7	84,2	86,7	96,7	76,7	86,7	86,7
	Ackersegen	16,7	3,3	46,7	66,7	33,3	33,3	40,0	53,3	23,3	37,5
Soltau	Erstling	70,0	83,3	93,3	96,7	85,8	50,0	80,0	93,3	73,3	74,2
	Sieglinde	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	91,7	93,3	46,7	58,3	72,2
	Bona	96,7	86,7	96,7	93,3	93,3	93,3	93,3	80,0	91,7	89,5
	Ackersegen	10,0	40,0	53,3	40,0	35,8	46,7	60,0	30,0	60,0	49,2
Uelzen	Erstling	60,0	96,7	86,7	80,0	80,8	26,7	100,0	66,7	86,7	70,0
	Sieglinde	100,0	96,7	100,0	100,0	99,2	40,0	73,3	36,7	53,3	50,8
	Bona	86,7	86,7	86,7	76,7	84,2	96,7	96,7	100,0	96,7	97,5
	Ackersegen	13,3	20,0	36,7	43,3	28,3	66,7	80,0	83,3	80,0	77,5

F (Sorten)	97,62***		60,77*** (ohne Erstling)	
F (Anbauorte) bei:	F 5 % =		F 5 % =	
Erstling	2,22°	(3,49)	6,45°	(8,74)
Sieglinde	2,10°	(5,84)	4,64*	(3,49)
Bona	2,50°	(3,06)	2,35°	(3,06)
Ackersegen	1,12°	(8,74)	4,25*	(3,49)

F. caeruleum, Sieglinde und Ackersegen für *P. foveata*). Die Anfälligkeit der Bonner Herkunft von Sieglinde übertrifft die aller anderen Herkünfte, die vom Hochmoor sogar um mehr als 100 %. Schon in früheren Versuchen fielen erhebliche Unterschiede in der Anfälligkeit verschiedener Herkünfte dieser Sorte auf.

Annähernd um 100 % unterscheiden sich auch die gemittelten Befallswerte zwischen den anfälligsten und widerstandsfähigsten Herkünften von Erstling (*Fusarium*) und Ackersegen (*Fusarium* und *Phoma*), obwohl der F-

Test keine ausreichenden Sicherungen ergeben hat. *P. foveata* hat durchweg die Knollen aus Bremervörde (Hochmoor) am wenigstens befallen. Für *F. caeruleum* haben sich die Sorten der Herkunft Soltau (Sandboden) am anfälligsten, die der Herkunft Bonn (lehmiger Sand) am widerstandsfähigsten erwiesen. Über derartige Unterschiede hat bereits Mooi (1950) berichtet. Er fand Kartoffeln von schweren Böden häufig resistenter für *F. caeruleum* als solche von Sandböden. Body (1952 a) konnte ebenfalls unterschiedliche Anfälligkeit für *F. caeruleum* beobachten, die er auf Bodeneinflüsse zurückführt. Lansade (1950) neigt der gleichen Ansicht zu und sieht eine Beziehung zwischen erhöhter Anfälligkeit und der Bereitschaft, früher zu keimen und dabei längere, aber dünnere Keime hervorzubringen, was Boyd allerdings nicht bestätigen konnte.

Es wäre verfrüht, aus den vorliegenden Ergebnissen feste Beziehungen zwischen bestimmten Böden und der Infektionsdisposition von Kartoffelknollen gegenüber *Phoma foveata* und *Fusarium caeruleum* ableiten zu wollen. Wenn offenbar Unterschiede in der „physiologischen" Anfälligkeit verschiedener Herkünfte einer Sorte bestehen, so kann darin zumindest eine Auswirkung aller am Anbauort herrschenden biotischen und abiotischen Faktoren gesehen werden. Im weiteren Sinne gehören dazu auch alle Maßnahmen des Menschen, wie vor allem die Wahl der Erntezeit, die wiederum bestimmend für den Reifegrad der Knollen ist. Spontanbefall unter den Bedingungen der Praxis wird weiterhin durch Erntemethoden sowie Art und Zeit von Sortierung und Verladung entscheidend bestimmt. Es bedarf also weiterer sorgfältiger Analyse aller unter dem Begriff Herkunft oder Standort zusammengefaßten Faktoren, um zu entscheiden, welche von ihnen für eine Änderung der Infektionsdisposition verantwortlich zu machen sind.

Zusammenfassung

Vom 5. November bis 5. Dezember 1957 wurden 19 deutsche Kartoffelsorten auf ihre „physiologische" Anfälligkeit für *Fusarium caeruleum* und *Phoma foveata* untersucht. Sie erwiesen sich alle als anfällig mit folgender durchschnittlicher Befallshöhe in Prozent:

	Fusarium caeruleum	*Phoma foveata*
> 75 %	Sieglinde, Sirtema, Sommerkrone, Capella	
50—74 %	Saskia, Augusta, Bona, Oberarnb. Fr.	Heida, Sieglinde, Bona, Corona Sirtema, Jakobi, Oberarnb. Fr., Vera
25—49 %	Lori, Vera, Heida, Erstling, Frühperle, Jakobi	Ackersegen, Saskia, Erstling, Augusta, Olympia, Sommerkrone, Lori, Carmen, Frühperle
1—24 %	Corona, Ackersegen, Olympia, Maritta	Maritta, Capella

Mittelfrüh- und spätreifende Sorten wurden von beiden Erregern überwiegend weniger befallen als Vorkeim- und Frühsorten.

Die Infektionsdisposition für *P. foveata* setzte bei den meisten Sorten später ein als diejenige für *F. caeruleum*. Gegenüber *P. foveata* scheinen Resistenzeigenschaften Anfang November vornehmlich in der Rinde der Knolle lokalisiert zu sein, so daß es zu „verdeckten", d. h. äußerlich nicht erkennbaren Fäulen kommt.

Die Inkubationszeit verkürzte sich bei der *Phoma*-Fäule (4 °C) von 32 (5. November) auf 19 Tage (5. Dezember), während sie bei der *Fusarium*-Fäule (16 °C) mit 16 Tagen unverändert blieb.

Die Befallswerte der Sorten Erstling (*F. caeruleum*), Sieglinde (*P. foveata*) und Ackersegen unterscheiden sich je nach Anbauort bis zu 100 %. Von Bona, Sieglinde (*F. caeruleum*) und Erstling (*P. foveata*) werden die Knollen aus allen Anbauorten fast unterschiedslos befallen. Für *F. caeruleum* waren die Sortenherkünfte vom Sandboden durchweg am stärksten, die vom sandigen Lehm bei Bonn am schwächsten befallen. Nicht abgetorftes Hochmoor scheint die Widerstandsfähigkeit der Knollen für *P. foveata* zu fördern. Alle diese Beziehungen lassen sich statistisch jedoch nicht genügend sichern.

Summary

From 5. 11. to 5. 12. 1957 the physiological susceptibility to *Fusarium caeruleum* and *Phoma foveata* in 19 German potato varieties has been investigated. All varieties are susceptible with an average rate of attack in % (listed above).

Early maincrop and maincrop varieties investigated have been attacked less severely than those of first and second early maturity, but exceptions occur.

The majority of the varieties became disposed to infection to *P. foveata* later than to *F. caeruleum*. Resistance to *Phoma*-rot in early November seems to be located in the cortex, which leads to „verdeckte Fäulen" i. e. rots no to be seen superficially.

While the incubation-period of *Fusarium*-rot remained constant with 16 days (at 16 °C) during time of experiments, that of *Phoma*-rot decreased from 32 to 19 days (at 4 °C) when tubers became more susceptible.

The rate of attack differs up to 100 % in Erstling (Duke of York; *F. caeruleum*), Sieglinde (*P. foveata*) and Ackersegen. From the varieties Bona, Sieglinde (*F. caeruleum*) and Erstling (*P. foveata*) tubers of all localities investigated will be attacked nearly without any difference. Tubers grown in sandy soils are most, those from sandy loam near Bonn least liable to *F. caeruleum*. Fenland seems to favour resistance to *P. foveata*. All these relationships, however, could not be proved statistically.

Literaturverzeichnis

Alcock, N. L., and C. E. Foister, 1936: A fungus disease of stored potatoes Scot. J. Agric. **19**, 252—257.

Ayers, G. W., 1956: The resistance of potato varieties to storage decay caused by *Fusarium sambucinum* f. 6 and *Fusarium caeruleum*. Amer. Pot. J. **33**, 249—254.

Braun, H., und Th. Voss, 1954: Die *Phoma*-Trockenfäule der Kartoffel. Kartoffelbau **5**, 15—17.

Boyd, A. E. W., 1952 a: Dry-rot disease of the potato. V. Seasonal and local variations in tuber susceptibility. Ann. appl. Biol. **39**, 330—338.

— —, 1952 b: Dry-rot disease of the potato. VI. Varietal differences in tuber susceptibility obtained by injection and riddle-abrasion methods. Ann. appl. Biol. **39**, 339—350.

Elarosi, H., 1957: Fungal associations. I. Synergistic relation between *Rhizoctonia solani* Kühn and *Fusarium solani* Snyder and Hansen in causing a potato tuber rot. Ann. Bot. NS **21**, 555—567.

Foister, C. E., 1940: Dry-rot diseases of potatoes. Scot. J. Agric. **23**, 63—67.

— —, 1952: The distribution and prevalence of potato Gangrene. Plant Path. **1**, 85—86.

— —, A. R. Wilson and A. E. W. Boyd, 1952: Dry-rot diseases of the potato. I. Effect of commercial handling methods on the incidence of the disease. Ann. appl. Biol. **39**, 29—37.

Kranz, J., 1958: Untersuchungen über die *Phoma*-Fäule der Kartoffelknolle unter besonderer Berücksichtigung des Wirt-Parasit-Verhältnisses. Phytopath. Z. **33**, 153—196.

Lansade, A., 1950: Recherches sur la Fusariose ou pourriture sèche de la pomme de terre *Fusarium caeruleum* (Lib.) Sacc. Ann. Epiphyties **1**, 157—207.

Middendorf, M., und J. Kranz, 1959: Einfluß der Vortemperatur auf Infektions- und Erkrankungsdisposition der Kartoffelknolle für *Alternaria porri* (E. M.) Neerg. f. sp. *solani*. Z. Pflanzenkrankh. **66**, 15—17.

Mooi, J. C., 1950: Het *Fusarium*-rot of droogrot bij aardappelen. Landbouwkundig T. **62**, 712—725.

Pearson, E. S., and H. O. Hartley, 1956: Biometrika Tables for Statisticians. Cambridge.

Schliemann, W., 1957: Anmeldung zur Pflanzkartoffelanerkennung in Hannover, Bayern, Schleswig-Holstein und Weser-Ems. Kartoffelwirtschaft **10**, 324—328.

Snedecor, G. W., 1946: Statistical methods. Jowa State Coll. Press.

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule, Braunschweig

Untersuchungen zur „Gelbnervigkeit" der Apfelsinenblätter *Citrus aurantium sinensis* (Gall.)

Von

W. Radatz

Mit 12 Abbildungen

A. Einleitung

Das „Citrussterben von Dörtyol" (Gassner 9) im türkischen Citrusanbaugebiet der Bucht von Iskenderun war durch Tiefpflanzung hervorgerufen worden. Die Blätter der mit dem Wurzelhals durchschnittlich 40 cm unter die erforderliche Pflanztiefe in den Boden versenkten Citrusbäume zeigten eine Chlorose, die eigentümlicherweise zunächst nur ihre Nerven erfaßte, mit Fortdauer des pathogenen Zustandes jedoch auch auf ihre Interkostalfelder übergriff.

Citruskrankheiten mit dem Symptom der Nervchlorose waren schon von Fawcett (8) beschrieben, als Ursache jedoch Infektionen des durch die Tiefpflanzung geschwächten Stammteiles angesehen worden. Dem stellte Gassner entgegen, daß die charakteristische Nervchlorose bereits auftritt, ehe eine Affektion der in das Erdreich versenkten Stammrinde zu erkennen ist, und prägte für die durch Tiefpflanzung hervorgerufene Erkrankung die Bezeichnung „Gelbnervigkeit", da diese den primären morphologischen Effekt darstellt. Als dann die gleichen Symptome an Blättern festgestellt werden konnten, deren Medianus durch Verletzung unterbrochen war, erkannte Gassner als Folge der Tiefpflanzung eine „physiologische Störung des absteigenden Saftstromes". Die Freilegung des vom Erdreich bedeckten Stammstückes ließ die erkrankten Bäume stets gesunden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Einblick in die Physiologie dieser Chlorose erlangt werden, indem nach experimenteller Unterbrechung des Assimilattransportes das Zustandekommen der Gelbnervigkeit verfolgt wurde.

B. Material und Methode

I. DIE REPRODUKTION DER „GELBNERVIGKEIT"

Zur Keimungsbeschleunigung wurden die polyembryonalen Samen der verschiedensten, hier gehandelten Apfelsinensorten geschält und die größten Embryonen in Petrischalen auf feuchten Sand gelegt. Die Keimlinge kamen dann in leichte Erde und wurden

zunächst im Schwitzkasten unter Dauerlicht im Wachstum forciert, später vorsichtig an das Gewächshausklima angepaßt und etwa im Fünfblattstadium getopft. Durch die so verkürzte Anzucht konnten im März etwa dreimonatige Pflanzen erstmals zu Versuchen benutzt werden: Blättern wurde ein Stück der Mittelrippe herausgetrennt, an anderen Pflanzen der Stamm oder die Seitentriebe geringelt. Während durch die so unterbrochene Assimilatzufuhr der basale Sproßteil in seinem Dickenwachstum zurückblieb, nahm der oberhalb der Ringelung befindliche Teil sichtbar an Umfang zu.

Verdunkelt wurden Pflanzen unter einem mit schwarzem Papier verkleideten Rahmen, zusätzliche Beleuchtung spendeten 14 dicht nebeneinander montierte Leuchtstoffröhren (Sylvania, Warmtone und White, 40 W).

Um das Verhalten der Spaltöffnungen festzustellen, wurden Infiltrationsversuche mit Äther unternommen. Da andere organische Lösungsmittel das Blatt nicht mehr infiltrierten, wenn Äther noch eindrang, konnte allein das Ausbleiben einer Ätherinfiltration als völliger Verschluß der Spaltöffnungen gewertet werden.

II. DER NACHWEIS DER SAUREN PHOSPHATASE IM CITRUSBLATT

Mit Hilfe der mikrochemischen Methode von Gomori (12) sollte versucht werden, in eine dem Kohlenhydratstoffwechsel zugeordnete Enzymtätigkeit Einblick zu gewinnen. Es war zu hoffen, daß bei entsprechender Anpassung der Methode ausschließlich die Färbung der enzymtragenden Zellstrukturen erfolgen und eine Aussage über abweichende enzymatische Aktivitäten ermöglicht würde, die im Zusammenhang mit der Nervchlorose ständen.

a) Die Gomori-Technik: Fixierten Gewebsschnitten wird in einem für die Reaktion optimal gepufferten und temperierten Medium in Gegenwart von Bleiionen ein phosphoryliertes Substrat geboten; am günstigsten β-Glycerophosphat (30). Im Verlauf der „Bebrütung", deren optimale Dauer zu ermitteln ist, wird die Phosphorsäure durch die in den Zellen vorhandene Phosphatase abgespalten und reagiert mit den gleichzeitig gebotenen Bleiionen zunächst zu einem mikroskopisch nicht sichtbaren Niederschlag, der durch Umwandlung in ein dunkles Sulfid in einem Amomniumsulfidbad erst „visualisiert" wird.

Um die Reaktion an das verwendete Objekt und Substrat anzupassen, mußte diese Grundreaktion nicht nur so variiert werden, daß eine Brutlösung günstigster Konzentration optimale Fällungsreaktionen erzielte, sondern daß sie diese auch in möglichst kurzer Zeit lieferte. Da nicht nur ihr pH-Wert, sondern auch die Konzentration der in ihr enthaltenen Pufferlösung die Stärke der Reaktion beeinflußte, war es angebracht, eine möglichst geringe Konzentration des Puffers zu verwenden. Sie mußte aber noch den einmal eingestellten pH-Wert der Brutlösung über die Dauer der Bebrütung konstant halten und eine für die Konstanz der immer wieder neu anzusetzenden Brutlösungen ungünstige Fällung ausschließen.

b) Die Brutlösung: Es wurde eine Stammlösung hergestellt aus

1,25 ccm mol. Acetatpuffer pH 5 (18),
0,5 ccm Bleinitrat 5%ig,
3,25 ccm Aqua dest.,
1,5 ccm Natrium-β-glycerophosphat (purum, Fluka) 2%ig.

(Diese Lösung war stets klar, so daß eine konzentrationsverschiebende Filtrierung nicht vorgenommen zu werden brauchte. Eine Entmischung trat aber relativ bald ein, daher wurde im Bedarfsfalle die Brutflüssigkeit im Eisschrank in der nachstehenden Endverdünnung aufbewahrt, in der sie sich am längsten fällungsfrei hielt.)

Hiervon wurden jeweils 0,5 ccm mit 2,5 ccm Aqua dest. verdünnt, so daß das Substrat schließlich in einer molaren Konzentration von 0,0035 in der Brutlösung vorhanden war, der Puffer mit 0,032 und Bleinitrat mit 0,0019 mol.

Die Kontrolle des pH-Wertes geschah durch Messung mit dem Lautenschläger-Ionometer. Sämtliches zur Verwendung kommende Wasser war in einer Quarzapparatur destilliert worden. Zu Kontrollversuchen wurde eine Stammlösung hergestellt, in der das Substrat durch die gleiche Menge Wasser ersetzt worden war.

c) Die Versuchspflanzen: Es wurden die aus den Untersuchungen zum I. Teil der Arbeit verbliebenen Pflanzen von *Citrus aurantium sinensis* verwendet wie auch aus den Samen der Statione di Frutticoltura e Agrumicoltura di Acireale (Sizilien)[1]) neu herangezogene Pflanzen von *C. aurantium amara*.

Dabei zeigte sich, daß die Bitterorangen nach einer Ringelung andere Symptome entwickeln als die Apfelsinen. Es kommt weder zu einer schnellen Ausbildung der Nervchlorose noch zu der Steiltracht. Erst nach Monaten ist eine schwache Nervaufhellung festzustellen, dafür treten aber die dem Medianus und einigen Nebennerven angrenzenden Interkostalfelder durch dunkelgrüne Färbung gegen das hellere Grün der restlichen Blattfläche hervor. Damit ist aber auch hier eine Reaktion in Nachbarschaft der Blattnerven, insbesondere am Medianus, eingetreten, die dem Charakter einer bei *Citrus* beobachteten Mangelkrankheit entspricht. Diese Feststellung deckt sich etwa mit den Angaben von COSTA et al. (7), wonach die sehr anfälligen Süßorangen schwere Krankheitssymptome entwickeln, während die sehr resistenten Bitterorangen im Falle einer Tristezainfektion nur gemäßigte Symptome hervorbringen. Das einheitliche Versuchsmaterial von *C. aurantium amara* wurde daher neben dem von *C. aurantium sinensis* nur zur Klärung der GOMORI-Technik verwendet; vergleichende Untersuchungen über differente Vorgänge bei normalen und gelbnervigen Blättern erfolgten aber ausschließlich an *C. aurantium sinensis*.

d) Die Fixierung: Da eine Apparatur zur Gefriertrocknung nicht zur Verfügung stand und auch gewisse Bedenken in ihrer Verwendung hinsichtlich einer aktivierenden Wirkung der Gewebsfrostung auf potentielle Enzymaktivitäten bestanden, wie sie etwa bei der Frostgummosis vorliegt, wurde mit den herkömmlichen Fixierungsmitteln nach einem brauchbaren Verfahren gesucht, das Zellstrukturen und Enzymaktivität schonend bewahrte.

Bei der Verwendung von 96%igem Alkohol zeigte sich mit fortschreitender Dauer eine allmähliche Abnahme an Umfang der Reaktion, was als eine gewisse Differenzierung nach Intensität oder Konzentration des Enzyms im Objekt angesehen und in einigen Fällen in diesem Sinne angewendet wurde. Soweit dieses aber nicht besonders erwähnt wird, wurde mit einer 1%igen Formaldehydlösung fixiert, die durch 4%igen Zusatz von molarem Acetatpuffer pH 5 (18) abgepuffert war. Um einerseits ein gleichmäßig schnelles Eindringen zu erreichen, andererseits auch störende Lufteinschlüsse zu entfernen, wurde sie im Vakuum infiltriert.

Aus den Blättern wurden mediane Streifen herausgeschnitten, die in kleine, etwa ½ cm² große Stücke zerteilt und, in kleinen Tablettenröhrchen mit Glaskugeln beschwert, mit dem Fixierungsmittel übergossen wurden. Die Röhrchen kamen in eine Saugflasche, es wurde kurz evakuiert und die alte Fixierungsflüssigkeit darauf gegen eine frische Lösung ausgetauscht.

e) Die Bebrütung: Nach der gewünschten Fixierungszeit wurden die Blattstücke kurz gespült und zwischen Holundermark mit der Hand geschnitten, die Schnitte dann bei mehrfachem Wasserwechsel in Aqua dest. gespült und anschließend in 3 ccm Brutlösung fassende Blockschälchen übertragen. Mit einem Glasdeckel verschlossen, wurden sie bei 37 °C im Thermostaten aufgestellt. Nach Ablauf der als optimal ermittelten Brutzeit von 35 Minuten wurden die Schnitte unter Einschaltung eines Bades in 2%iger Essigsäurelösung wieder in Aqua dest. gespült. Zur Vermeidung von Diffusionsverlusten durfte dieser Vorgang nicht über die hierfür notwendige Zeit ausgedehnt werden und mußte, besonders in bezug auf das Essigsäurebad, konstant gehalten werden. Das gleiche galt auch für das Auswaschen der Fixierungsflüssigkeit.

f) Die Visualisation: Nach dem Spülen wurden die Schnitte in Ammoniumsulfid übertragen. Um eine Fällungsakkumulation zu verhindern, wurde eine schwachprozentige Lösung verwendet; es genügte in den meisten Fällen die Einwirkung einer 0,1%igen Lösung Ammoniumsulfid (Merck) über die Dauer von ½ bis 1 Minute. Vergleichende Untersuchungen erfordern aber auch hier die Konstanz von Konzentration und

[1]) Dem Direktor der Station, Herrn Professor Dr. GAETANO RUGGIERI, sei an dieser Stelle für die Übersendung aufrichtig gedankt.

Zeit. Die anschließend in Aqua dest. gespülten Schnitte wurden im gleichen Medium unter dem Mikroskop beobachtet.

C. Einführende Betrachtungen

a) Die Anatomie des Citrusblattes

Das dorsiventrale Citrusblatt ist mit Ausnahme der Spaltöffnungen über der Blattmittelrippe hypostomatisch. Schon von Petri (22) werden diese Spaltöffnungen in der oberen Epidermis genannt, auch Gassner (10) weist im Zusammenhang mit Infektionen darauf hin und gibt für das Limonenblatt eine Dichte von 189 Spaltöffnungen je Quadratmillimeter auf der Blattmittelrippe an, entgegen 612 auf der Blattunterseite.

Unter der einschichtigen oberen Epidermis liegt ein doppelschichtiges Palisadenparenchym von charakteristischer Ausprägung, darunter eine Reihe rundlicher Zellen, welche die Verbindung zu den locker gefügten Schwammparenchymzellen oder den Leitbündelscheiden vermittelt. Auch sie ist mit Chloroplasten dicht angefüllt und kann als dritte Reihe zum Palisadenparenchym gezählt werden. Während das Schwammparenchym nur über eine geringe Menge von Chloroplasten verfügt, sind die wieder enger gefügten Zellen an der unteren Epidermis reichlich damit versehen und müssen als zweites Assimilationsparenchym angesprochen werden.

Die Seitennerven besitzen ein kollaterales Leitbündel mit ventralem Leptom, der Medianus ein zweigeteiltes, amphikribrales Leitbündel mit zentralem Mark. Diese bei den Rutaceen verbreitete Form (Schulze 25) kommt

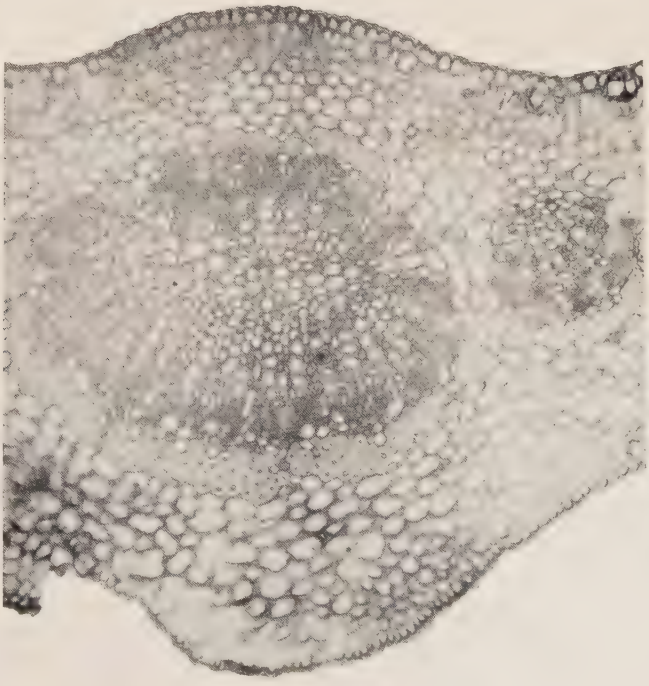


Abb. 1.
Querschnitt durch den Medianus von *Citrus aurantium sinensis* (Gall.). Das von zwei Durchlaßstreifen zweigeteilte amphikribrale Leitbündel.
Rechts das kollaterale Leitbündel des Nebennerven mit ventralem Leptom

dadurch zustande, daß im Sproß einzelne Partien des Zentralzylinders weiter nach außen rücken, ein Hufeisen bilden und sich dann durch weiteres Einwärtsdrehen des Xylems an dessen Enden zu einem zentrischen Gefäßbündel schließen.

In der Spreite sind die durch Betonung eines Markstrahls zumeist beiderseits gebildeten Durchlaßstreifen die Ursache zur Zweiteilung des Gefäßbündels (Abb. 1): über dem größeren ventralen Teil liegt, um 180 ° gedreht und daher mit dorsalem Leptom versehen, ein kleinerer Bündelteil. Beiden schmiegt sich eine Sklerenchymkappe an, auf die nach außen die Zellen der Bündelscheide folgen. Diese lenken in die Durchlaßstreifen ein und verbinden das Mesophyll mit dem Leitbündelmark. Von dort radial ausgehende Markstrahlen sichern die Weiterleitung in die Siebteile, die aber auch durch parenchymatische Lücken in den Sklerenchymkappen direkt mit der Bündelscheide verbunden sind. Zwischen Phloem und Xylem liegt ein lange Zeit tätiges Kambium. Die Seitennerven erster Ordnung werden nur vom unteren Teil des Leitbündels abgegliedert, wodurch ihre normale Form gesichert ist.

Calciumoxalatkristalle treten in auffällig hoher Zahl in der Bündelscheide auf, aber auch im Phloemparenchym und im medianen Mark. Sehr zahlreich sind sie auch zwischen die Palisaden- und Epidermiszellen eingeschoben. Nach v. GUTTENBERG (14) wachsen sie aus subepidermalen Schichten in die Epidermis ein. Eine starke Kutikula schließt die Epidermiszellen, deren horizontale Wände dicke Zelluloselamellen haben, nach außen ab. Öldrüsen kommen regellos verstreut im gesamten Mesophyll vor; sie werden nach SIECK (26) schizogen angelegt und lysigen erweitert. Das obere Assimilationsparenchym setzt sich von den Blattflügeln her in den Medianus fort, wobei es allerdings oft seinen typischen Palisadencharakter durch Abrundung der Zellen verliert. Auch die darunterliegenden Zellen sind reich an Chloroplasten. Das untere Assimilationsparenchym streicht zuweilen in der ventralen Ausbuchtung des Mittelnerven aus, relativ inhaltsarme Zellen füllen den subfaszikulären Raum.

b) Anatomisch-physiologische Gesichtspunkte

Es soll hier versucht werden, die physiologische Bedeutung gewisser Eigenarten des Citrusblattes zu erfassen, die für die Auswertung der in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen bedeutend erscheinen. Die Ausbildung von Spaltöffnungen auf der Blattoberseite, und zwar nur über dem Medianus, darf als die auffälligste Eigentümlichkeit angesehen werden. Unterstellt man hierfür eine Notwendigkeit, ließe sie sich vielleicht aus der folgenden Betrachtung erklären.

Im dorsalen Bogen des Medianus befindet sich ein gut entwickeltes Assimilationsparenchym, das nach unten nicht in ein lockeres Schwammparenchym übergeht, sondern von einem relativ festgefügten Chlorenchym fortgesetzt wird. Darunter folgt der epifaszikuläre Bogen der Bündelscheide, deren Zellen sich durch Lücken in der oberen Sklerenchymkappe mit dem Phloem des inversen Leitbündelteils verbinden. Weiter seitlich münden die Durchlaßstreifen, und flankiert wird das mediane Gefäßbündel von den Leitbündeln sich abgliedernder Seitennerven. Diese verschiedenen Gewebe haben gemeinsam, daß sie physiologisch hoch aktiv sind und darüber hinaus auch am weitesten von den Spaltöffnungen der unteren Epidermis entfernt liegen. Damit nimmt der Gewebekomplex im dorsalen Bogen des Medianus eine gewisse Sonderstellung

im Blatt ein, der die Pflanze Rechnung tragen muß. Es wäre fraglich, ob bei Fehlen der Spaltöffnungen über der Mittelrippe der Gasaustausch der dort assimilierenden und stoffleitenden Zellen ausreichend stattfinden könnte. Sauerstoff und Kohlensäure müßten von den Blattflügeln her über die teilweise sehr geringen Interzellularen, quer durch die hier größte Blattiefe diffundieren. In diesem Zusammenhang erscheint es nicht unwesentlich, daß sich durch die Abrundung der Assimilationszellen des Medianus das Verhältnis zwischen deren Oberfläche und ihrem Inhalt zuungunsten der den Gaswechsel gestattenden Oberfläche verändert hat.

Hieraus muß gefolgert werden, daß die Citruspflanze mit Hilfe der dorsalen Spaltöffnungen einem Defizit in der Luftversorgung entgegenwirkt, das gegebenenfalls im Gewebe des Medianus auftritt. Im Falle der Einschränkung des Gaswechsels durch Verschluß der Spaltöffnungen muß sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Sauerstoffmangel im Medianus zuerst bemerkbar machen.

Gleichfalls nicht unbedeutend erscheint die sehr große Menge der Calciumoxalatkristalle, die das Blatt bevorzugt um und in den Leitbündeln wie auch im Palisadenparenchym anlegt, von wo sie in einer Art von Selbstreinigungsprozeß in die Epidermis eingeschoben werden. Beides sind zweifellos Stätten des höchsten Kohlenhydratumsatzes innerhalb des Blattes.

Der Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanzen gestaltete sich in den Winter- und Frühjahrsmonaten stets am auffälligsten; es waren dann sämtliche Parenchymzellen der Blätter mit Stärkekörnern angefüllt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von SMITH et al. (28), die jeweils einen beträchtlichen Anstieg des Kohlenhydratspiegels in den Blättern der Valencia-Orange während dieser Monate im Zusammenhang mit dem von den Bäumen zu bewältigenden Blattzuwachs und der Blütenbildung erkennen lassen. Während der Zeit dieser beträchtlichen Stärkeschoppung war eine Beeinträchtigung des Chlorophyllgehaltes der Blätter nicht feststellbar. Nach Abklingen dieser endogen induzierten Perioden war die Menge der im Mesophyll, besonders aber im Parenchym des medianen Leitbündels nachweisbaren Stärke unbedeutend; frei fluktuierende Zucker sind aber stets im Blatt nachweisbar (28).

D. Versuche und Ergebnisse

I. DIE „GELBNERVIGKEIT" IM ZUSAMMENHANG MIT DER STÄRKESCHOPPUNG

a) Bei natürlichem Wechsel von Tag und Nacht

1. Durchtrennung des Medianus

Die Mittelnerven wurden in den verschiedensten Altersstufen des Blattes durchtrennt; anfangs an den noch jungen Bäumchen, später ebenso bei älteren Pflanzen. Niemals konnte unter den normalen Kulturbedingungen im Gewächshause und an den im Sommer im Freien gehaltenen Versuchspflanzen eine Chlorose der Nerven im apikalen Teil des Blattes erzielt werden, wie sie GASSNER (9) an verletzten Blättern beobachtet und dann auch durch den

gleichen Eingriff im Laufe von zwei bis drei Wochen reproduziert hatte. Der notwendige pathogene Überschuß an Assimilaten konnte sehr wahrscheinlich über die anastomosierenden Nebennerven abgeleitet werden. Die Versuche, mittels Durchtrennung weiterer Nebennerven eine stärkere Schoppung der Assimilate im Spitzenteil des Blattes herbeizuführen, ergaben keine eindeutigen Befunde, da Welkeerscheinungen auftraten. Daher wurden diese Versuche zunächst unterbrochen und mit geringelten Pflanzen experimentiert.

2. Ringelung des Sprosses

α) Morphologische Befunde

Im März angebrachte Ringelungen des Stammes führten nach Verlauf eines Monats zu einer deutlichen Reaktion. Im Mai applizierte Ringelungen ließen schon nach vierzehn Tagen deutlich den Beginn der Nervaufhellung eintreten. Die Chlorose verbreitete sich dann schnell über alle Nebennerven, so daß sie selbst mit ihren feinsten Verästelungen hell vom dunkelgrünen Blatt abstachen. Die Aufhellung der Nerven wird im weiteren Verlauf der Erkrankung immer stärker, die Zone — besonders an der Basis der Mittelnerven — etwas breiter. Das gelbe Netzmuster der Nerven auf der Blattoberfläche ist in diesem Stadium ein leicht wahrzunehmendes Symptom und derart charakteristisch gegenüber anderen Formen der Blattchlorose, daß es zur Benennung der Erkrankung verwendet wurde.

Die Chlorose bleibt aber nicht auf die Nerven beschränkt, sondern ergreift im Verlauf weiterer Monate auch die Interkostalfelder des Blattes. Die Blätter werden dann gelbgrün, schließlich gelb, doch jeweils mit noch hellerer, bis weißgelber Nervzeichnung; im gleichen Maße hellen auch die Blattstiele auf. Auch in diesem Stadium unterscheidet sich das erkrankte Blatt von anderen Chloroseformen dadurch, daß sein Mittelnerv niemals dunkler als die Interkostalfelder erscheint. Es ähnelt eher Altersblättern, in denen resorptive Abbauprozesse das Chlorophyll zerstört haben und nur noch Karotinoide zurückgeblieben sind.

Blätter, die unterhalb der Ringelung am Stamm oder hier abzweigenden Seitensprossen inseriert sind, behalten stets ihre dunkelgrüne Färbung und — was vom nachstehend Beschriebenen gleichfalls auffällig absticht — ihre normale Stellung. Als weitere eigentümliche Reaktion konnte hierbei erstmals die auffällige Steiltracht der gelbnervigen Blätter beobachtet werden. Die kranken Blätter sind um einen augenscheinlichen Winkel aus ihrer normalen Stellung emporgehoben, so daß die Blattstiele der am Gipfelsproß stehenden gelbnervigen Blätter dem Sproß nahezu anliegen. Die daraufhin geprüften Abbildungen von GASSNER (9) zeigen die gleiche Eigentümlichkeit an tiefgepflanzten Citrusbäumen wie auch an Bäumen unterschiedlichen Alters, die durch Tierfraß geringelt wurden (dort Abb. 11, 18 links, 19, 20. Die Steilstellung der erkrankten Blätter ist ebenso gut zu erkennen wie ihre Verfärbung). Die Übereinstimmung der Ergebnisse auch in diesem Punkte ist bemerkenswert.

β) Der Einfluß der Vegetationsperiode

In den Monaten April und Mai tritt die Gelbnervigkeit nach Ringelung des Sprosses am schnellsten auf. In diesen Monaten ist die physiologische Aktivität der Citruspflanzen im Zusammenhang mit der Frühjahrsblattausschüttung und der Blüte, zumindest hinsichtlich des Zuckerstoffwechsels, verstärkt; zu dieser Zeit zeigen die normalen Blätter schon einen auffällig hohen Stärkespiegel. In den Sommermonaten wird die Latenzzeit wieder größer, und im Herbst, wo die abnehmende Tageslichtmenge wohl als wesentlicher begrenzender Faktor hinzutritt, führen Ringelungen nur noch selten zu einer Nervchlorose.

γ) Anatomische Befunde

Blattquerschnitte zeigen zu Beginn der Gelbnervigkeit außer einer schwachen Abstufung der Chloroplasten im medianen Gewebe zum Gelbgrünen hin keinen Unterschied zu den Querschnitten von Blättern während der endogenen Stärkeschoppung. Mit fortschreitender Gelbnervigkeit ändert der Befund sich dahingehend, daß die Stärkekörner nicht mehr von ihren Plastiden umhüllt sind, sondern, das Zellumen völlig ausfüllend, scheinbar frei in der Zelle liegen. Die Chloroplasten sind entweder völlig verschwunden oder derart überdehnt und vom Chlorophyll befreit, daß sie nicht mehr wahrgenommen werden können. Von dieser abnormen Stärkeschoppung sind alle parenchymatischen Zellen des Blattes betroffen, der Blattquerschnitt erscheint nicht mehr grün, sondern graugelblich.

Zu der Beobachtung dieser übersteigerten Stärkeablagerung in den Mesophyllzellen, die bei der normalen, endogen induzierten Stärkeschoppung auch erhöhte Mengen an Stärke aufnehmen können, kommt ein weiterer auffälliger Befund: die Zellen der oberen und unteren Epidermis speichern bei der pathologischen Erhöhung des Kohlenhydratspiegels ebenfalls Stärke. Dieses konnte bei der endogenen Frühjahrsstärkeschoppung niemals beobachtet werden. Es zeigt deutlich, welchen Überfluß an Kohlenhydraten das gelbnervige Blatt zu erleiden hat. Das Auftreten von Stärkekörnern in den peripheren Zellschichten von Öldrüsen besagt das gleiche.

Mit Blaulicht bestrahlt, fluoreszieren die Palisadenzellen im gleichen gelbgrünen Licht wie die Gefäße. Nur Inseln dazwischen geben die normale Rotfluoreszenz des Chlorophylls. Dieses entspricht dem morphologischen Bild des Blattes, das einige grüne Inselchen im Gelb der Interkostalfelder eingesprengt erkennen läßt. Als Pigmente sind dem Blatt im wesentlichen nur Karotinoide verblieben. Auffällig ist aber, daß die Zellen des unteren Assimilationsparenchyms, die sich also in nächster Nähe der Spaltöffnungen befinden, noch fast lückenlos rot fluoreszieren. Der Sauerstoffversorgung der Blattzellen scheint damit besondere Bedeutung im Krankheitsverlauf zuzukommen.

Blattquerschnitte normaler Pflanzen weisen in den Sommer- und Herbstmonaten nur transitorische Assimilatmengen auf. Die Blätter geringelter Pflanzen fallen dagegen stets durch den anomal hohen Stärkegehalt auf, mit dem der progressive Verlust des Chlorophylls immer einhergeht. Zu dieser Zeit ist zwischen den geringelten und normalen Pflanzen der Unterschied in

der Menge der in und um das Leitbündel des Blattmittelnerven eingelagerten Stärkekörner besonders auffällig. Die Stauung des Assimilatstromes ist ganz offenbar. Die Stärkeschoppung hat jedoch nicht nur im Blatt, sondern auch im Sproß stattgefunden. Auch hier sind alle parenchymatischen Zellen oberhalb der Ringelung mit wesentlich mehr Stärke angefüllt als unterhalb der assimilatleitenden Prosenchyme. Für die Überbrückung der Ringelung durch das Holzparenchym bestehen keine Anzeichen.

b) Variierung des Lichtfaktors

Es wurde nun versucht, die Beschleunigung der Entstehung von Nervchlorosen durch verstärkte Assimilation herauszustellen. Hierzu wurde im Dezember eine Partie Citruspflanzen mit geringelten Zweigen unter Dauerbeleuchtung gestellt. Bei dieser Gruppe befanden sich auch Pflanzen, bei denen nur die Blattmittelnerven durchtrennt waren. Eine zweite Partie geringelter Pflanzen verblieb ohne Zusatzbeleuchtung im normalen Wechsel von Tag und Nacht. Eine dritte Gruppe geringelter Citruspflanzen erhielt täglich nur 4 Stunden Tageslicht.

1. Dauerlicht

In zeitlicher Übereinstimmung mit den ersten Versuchen, bei denen geringelte junge Pflanzen im März und April bei Tageslicht gelbnervig wurden, zeigte sich bei den geringelten Dauerlichtpflanzen schon nach 3 Wochen der Beginn der Nervaufhellung, Nach weiteren 2 bis 3 Wochen waren die Blätter der geringelten Zweige stark gelbnervig. Bei dieser Versuchsgruppe konnte nun eine weitere Beobachtung gemacht werden, die für die Beurteilung der Symptombildung von Bedeutung erscheint. Ein einzelnes Blatt (A!), das in unmittelbarer Nähe der warmen Beleuchtungsröhren an einem ungeringelten Zweige gewachsen war, zeigte eine sehr ähnliche Nervchlorose, wenn hier auch stärker die feinen Nebennerven von der Chlorose erfaßt und der Medianus und einige Nebennerven mehr oder weniger grün geblieben waren.

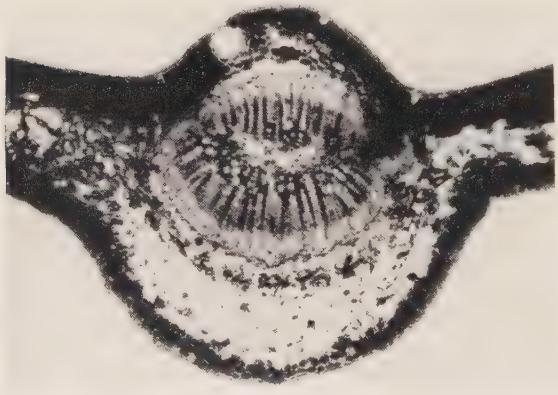


Abb. 2. Medianusquerschnitt eines gelbnervigen Blattes. JJK-gefärbt. Stärkeschoppung in Mesophyll- und Epidermiszellen

Der anatomische Befund an den gelbnervigen Blättern geringelter Zweige ergab die gleiche Stärkeschoppung im Mesophyll, im Leitbündel des Medianus und in den Zellen der Epidermis, wie sie bei den ersten Ringelungsversuchen beobachtete werden konnte, die an Pflanzen vorgenommen wurden, welche im Frühjahr bei normalem Ta-

geslicht wuchsen. Die Abbildung 2 zeigt einen mit JJK gefärbten Schnitt. Im Blatt (A!) war die Stärkeschoppung nicht so stark und der Chloroplastenschwund nicht vollständig.

Die bei der Dauerlichtgruppe gehaltenen Blätter mit durchtrenntem Medianus waren im apikalen Teil der Spreite gleichfalls gelbnervig geworden. Die Tageslichtmenge hatte wahrscheinlich nicht zur Symptombildung ausgereicht. Erst die zusätzliche Beleuchtung hatte die notwendige Erhöhung des Kohlenhydratspiegels bewirkt, die durch Behinderung des Abtransportes zur pathogenen Stärkeschoppung und zur Gelbnervigkeit führt. Ungeringelte Sprosse oder nicht abnorm erwärmte Blätter scheinen die verstärkte Assimilation durch entsprechende Assimilatableitung und vergrößerte dissimilatorische Tätigkeit kompensieren zu können, wobei das Gleichgewicht zwischen diesen Prozessen, insbesondere aber das Ausbleiben pathologischer Atmungsvorgänge, wie sie für das Blatt (A!) angenommen werden müssen, von ausschlaggebender Bedeutung für das Ausbleiben einer Nervchlorose ist. Blattquerschnitte wiesen bei den symptomfreien Pflanzen auch nie die abnorme Form der Stärkespeicherung in der Epidermis auf, sondern sie beschränkten die Anhäufung der Stärke auf das Mesophyll.

2. Normallicht

Die geringelten Pflanzen dieser Gruppe konnten nur während des normalen Winterkurztages assimilieren. Sie blieben — mit wenigen Ausnahmen — bis in den März von einer Chlorose verschont. Erst im April begann bei ihnen die Gelbnervigkeit aufzutreten. Dabei konnte beobachtet werden, daß die älteren Blätter zuerst mit der Aufhellung der Nerven begannen, während die jüngsten, noch in der Entwicklung begriffenen Blätter zunächst allgemein aufhellten, um erst dann mit der charakteristischen Nervchlorose zu folgen. Hierbei scheint nicht nur eine Rolle zu spielen, daß der durch die Entwicklung der Spreite verstärkte Baustoffbedarf das Überangebot an Assimilaten zunächst noch abnehmen kann, wodurch vielleicht die pathogene Stärkeschoppung anfänglich vermieden wird, sondern daß auch der in der Jugend der Blätter andersgeartete physiologische Zustand die Abweichung in der Reaktion verursacht.

Der anatomische Befund ließ bei den Blättern auch dieser Versuchsgruppe ein Anwachsen der Menge zwangsdeponierter Stärke klar erkennen, wenn auch ein ganz einheitliches Bild, vermutlich in Abhängigkeit von der zu dieser Jahreszeit unterschiedlichen Aktivität der einzelnen Versuchspflanzen, nicht erhalten wurde. Die Uneinheitlichkeit des zur Verfügung stehenden Versuchsmaterials mit vielleicht unterschiedlichem Reaktionsvermögen auf den durch die Jahreszeit eingeschränkten Lichtgenuß hatte zur Folge, daß einige der Versuchspflanzen trotz der ungünstigen Lichtverhältnisse ungebrochen mit der endogenen Stärkeschoppung einsetzten und von sich aus schon einen erhöhten Kohlenhydratspiegel in den Blättern erzeugen konnten, während die restlichen Pflanzen erst mit steigendem Licht dazu fähig waren.

Hierdurch hatten einige Pflanzen schon zu Beginn des Monats Januar ihre Blätter bis in die Epidermis mit Stärke angefüllt. Nur bei diesen trat

schon jetzt Gelbnervigkeit auf. Bei den anderen Pflanzen dieser Gruppe waren zu dieser Zeit in der Epidermis keine und in der ersten Palisadenreihe nur winzige Stärkekörnchen erkennbar. Erst die zweite Reihe des Palisadenparenchyms und die darunterliegende Zellreihe führten größere Mengen Stärke. Im Laufe der darauffolgenden Monate füllten sich dann auch die bisher frei gebliebenen Zellen des Mesophylls und schließlich auch die Epidermiszellen mit einer Übermenge an Stärkekörnern. Erst jetzt begann bei dieser Gruppe die Gelbnervigkeit allgemein aufzutreten. Eine so kurzfristige Reaktion auf die Ringelung, wie sie sich bei den Pflanzen der Dauerlichtgruppe eingestellt hatte, konnte bei der Tageslichtgruppe jedenfalls nicht beobachtet werden. Die Mitbeteiligung einer physiologischen Bereitschaft, wie sie zur Zeit der endogenen Stärkeschoppung vorliegt, ist für die rasche Ausbildung der Gelbnervigkeit hiernach nicht unwesentlich.

3. Vier Stunden Tageslicht

Die Pflanzen dieser Gruppe, deren Lichtgenuß durch Verdunkelung auf ein so geringes Maß beschränkt wurde, blieben bis zum Abbruch des Versuchs im Sommer, nachdem die Pflanzen der anderen beiden Gruppen längst schon gelbnervige Blätter bekommen hatten, völlig dunkelgrün. In ihren Blättern waren stets nur geringe Mengen an Stärkekörnern nachweisbar.

Die zwangsläufig gering gehaltene Assimilation führte zu keiner Aufstauung der Kohlenhydrate, der die normale Dissimilation nicht gewachsen war. Wurden Pflanzen dieser Gruppe jedoch unter Dauerlicht oder im Frühjahr wieder zu den Pflanzen im normalen Tageslicht gestellt, so entwickelten auch sie die Chlorose der Blattnerven.

4. Versuch der Regeneration durch Verdunkelung

Als Umkehrung zu den voraufgegangenen Versuchen wurden Verdunkelungen bereits gelbnerviger Pflanzen vorgenommen. Offenbar in Abhängigkeit vom Grad der Chlorophyllzerstörung und anderer irreversibler Schädigungen des Plasmas waren im fortgeschrittenen Stadium der Gelbnervigkeit keine Regenerationen des Chlorophylls festzustellen. Nur in den Fällen, wo die Nervchlorose sich gerade zu zeigen begann, schien eine Regeneration einzutreten. Es wird dieses aber mit aller Zurückhaltung genannt, da hinsichtlich der richtigen Dosierung von Hell- und Dunkelphasen, die einerseits den Abbau der Stärkeschoppung bewirken, andererseits aber eine Lichtmangelchlorose vermeiden sollte, Schwierigkeiten auftraten.

c) Infiltrationsversuche

Nach anfänglichem Gleichklang zwischen gleich alten Blättern eines geringelten und denen eines ungeringelten Zweiges ein und derselben Pflanze im normalen Tag/Nacht-Wechsel blieben die Stomata der nervchlorotischen Blätter größtenteils geschlossen. Bei den meisten gelbnervigen Blättern fand

überhaupt keine Infiltration mehr statt. Nur bei den jüngsten Blättern konnte stellenweise der Äther durch die Spaltöffnungen in die Interzellularräume des Blattes hineindiffundieren.

Ein solches Blatt, das kurz vor Ausbildung der Gelbnervigkeit infiltriert wurde und an diesen Stellen die Abtötung des Gewebes erlitt, zeigt Abbildung 3. Das Blatt war am geringelten Zweige belassen worden und wurde zusammen mit den anderen Blättern gelbnervig. Das Vordringen der Chlorose (weiß) über die Seitennerven (a) und (b) von der am stärksten erkrankten Blattbasis aus ist gut zu erkennen. Ihre Ausbreitung von der Blattmitte aus ist durch die Nekrosen (schwarz) verhindert worden; dieses ist besonders bei (e) sehr auffällig. Bei (c) hat sich eine Chlorose entwickeln können, da der bei (d) abzweigende Seitennerv in einer lebend gebliebenen Lücke zwischen nekrotischem Gewebe beginnt.

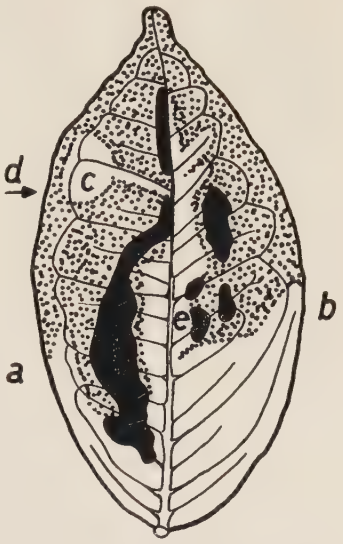


Abb. 3. Ausbreitung der Gelbnervigkeit nach Infiltration

d) Das gelbnervige Altersblatt

Alte, total chlorotische Blätter wurden auf ihren Gehalt an Stärke untersucht. Wie dies auch von Gassner (9) mitgeteilt wird, konnte in solchen Blättern, die manchmal ein Jahr lang an der Pflanze verblieben waren, nur noch eine geringe Menge Stärke festgestellt werden. Oft waren es nur einzelne überdimensionale Stärkekörner. Es ist anzunehmen, daß die Stärke im wesentlichen im Blatt selbst veratmet wurde und eine Schädigung der betreffenden Enzyme durch die Gelbnervigkeit nicht stattfand.

e) Diskussion der Befunde über die „Gelbnervigkeit"

Die „Gelbnervigkeit" entsteht bei *Citrus aurantium sinensis* im Verlauf einer pathologischen Stärkeschoppung. Vermutlich induziert allein der enorme Assimilatüberschuß der Blattzellen eine gesteigerte und schließlich pathologisch entartete Dissimilation, wie sie etwa für das Blatt (A!) angenommen wird. Der krampfartige Verschluß der Spaltöffnungen ist vielleicht schon die Folge einer CO_2-Anreicherung durch die gesteigerte Atmung, da sie eine Verringerung der Spaltöffnungsweite hervorrufen kann (Heath 16). Hierdurch muß aber ein Sauerstoffmangel und die Tendenz zur unvollständigen Verbrennung der Kohlenhydrate eintreten. Insbesondere betrifft die durch den Assimilatrückstau und den zunächst weiterlaufenden Zustrom aus den Mesophyllzellen gleichsam „überfütterten" (Kursanov 19) und zu gesteigerter Atmung stimulierten Leitbahnen die Diskrepanz zwischen veratmungsfähigem Substrat und benötigtem Sauerstoff. Auch die Ausführungen zur Blattanatomie zeigen, daß eine Beeinträchtigung der Stomatafunktion für den Medianus besonders be-

drohlich sein muß. Damit wird verständlich, daß die pathologischen Veränderungen hier symptomatisch zuerst erkennbar werden. Soweit nicht auch schon gleiche physiologische Voraussetzungen die Chlorose in den Nebennerven verursachen, scheint ein Fortschreiten eines den Chlorophyllapparat zerstörenden Agens aus dem Medianus zu ihnen hin vorzuliegen, wie es die Anmerkungen zur Abbildung 3 darlegen.

Vergleicht man die von HAAS (15) veröffentlichten Abbildungen (dort 23, 24) von Kaliumüberschuß- und Calciummangelpflanzen, die Kalium- und Calciumwerte in der Analyse tristezakranker und normaler Orangen (GRANT et al. 13) sowie die Angaben von SMITH und REUTHER (27) über den Kaliumrückstau bei Unterbrechung der Assimilatleitung, so könnten der Beginn der Nervchlorose am Medianus und die Steiltracht eine gemeinsame Erklärung darin finden, daß einem akropetal zunehmenden Kaliumüberschuß ein in Stoffwechselvorgängen erschöpfter Calciumvorrat nicht mehr entgegenzuwirken vermag.

Als Ursache der Stärkeschoppung im tiefgepflanzten Orangenbaum muß Sauerstoffmangel angesehen werden, der durch die Versenkung des betroffenen Stammstückes in das Erdreich hervorgerufen wird und die Aktivität des Phloems beeinträchtigt (siehe auch ZIEGLER 35), das wahrscheinlich aktiver, der Atmung bedürftiger Prozesse zur Beförderung der Assimilate bedarf (WILLENBRINK 32, KURSANOV 19). Dabei kommt die jahreszeitliche Stärkeschoppung in der Citruspflanze der pathogenen Entwicklung nicht unwesentlich entgegen.

II. DER NACHWEIS DER SAUREN PHOSPHATASE UND DESSEN DISKUSSION

a) Allgemeine Übersicht

Ein normales, ausdifferenziertes Blatt zeigt vor Beginn der Stärkeschoppung eine Reaktion im gesamten Mesophyll und in einigen Epidermiszellen; sie ist jedoch im Palisaden- und unteren Assimilationsparenchym sowie in den Leitbündeln am stärksten, schwächer im Schwammparenchym und am geringsten in der ventralen Ausbuchtung des Medianus. In der Epidermis sind nur die Schließzellen, manchmal aber auch ihnen unmittelbar benachbarte Zellen gefärbt, in den Nebennerven die Bündelscheiden, die Siebelemente und eigenartigerweise auch die Gefäße. Im Medianus hebt sich der hypofaszikuläre Bogen der Bündelscheide von den darunterliegenden schwach gefärbten Zellen ab, ebenso die in das Mark einbiegenden Durchlaßstreifen. Die um das Mark gruppierten Xylemprimanen und die sie umgebenden, zu den Markstrahlen einleitenden Parenchymzellen sind tief dunkelbraun bis schwarz. Die Markstrahlzellen sind meist schwächer gefärbt, ebenso das Phloem, in dem die geschwärzten großen Parenchymzellen auffallen. Das obere Assimilationsparenchym verhält sich wie in den Blattflügeln, das untere wird nur so weit geschwärzt, als es in die untere Ausbuchtung hineinfaßt. Hier isoliert liegende, geschwärzte Zellgruppen befinden sich direkt über Spaltöffnungen.

Ein Vergleich von im anatomischen Bau sich unterscheidenden Schnitten zeigt, daß die stärksten Fällungen stets vom Assimilationsparenchym zu den

nächstliegenden Bündelscheiden hinüberziehen, deren Zellen oft ein grobmaschiges, knotenbesetztes Netzwerk aufweisen. Bei geschlossenem Bündelrohr ist die Schwärzung der Bündelscheide besonders stark und setzt sich durch die Sklerenchymkappen in den Siebteil, besonders in dessen Parenchym fort; sind Durchlaßstreifen vorhanden, folgt sie diesen in das Mark hinein und findet ein auffälliges Maximum im Bereich der Xylemprimanen. Von dort zieht sich die Schwärzung über die Markstrahlen bis in den Siebteil hinein, verbindet sich jetzt also vom Zentrum aus mit dem Phloemparenchym. Befindet sich in unmittelbarer Nähe des Medianus ein Nebennerv, ziehen die Fällungen vom Assimilationsparenchym zu ihm hin, und der mediane Leitstrang bleibt auf der dem Nebennerven zugekehrten Seite geringer geschwärzt als auf der gegenüberliegenden Seite.

Hieraus darf auf Dephosphorylierungsprozesse geschlossen werden, die sich von den Entstehungsorten der Assimilate zu den Leitbahnen hin und auch noch in diesen selbst abspielen und mit der Fluktuation der Kohlenhydrate in engem Zusammenhang stehen müssen. Die als Reaktion auf den Phosphatasenachweis entstehenden Streifen stark geschwärzter Zellen stellen vermutlich „Zugstraßen der Kohlenhydrate" dar. Differenzierungen mit Hilfe längerer Fixierung in 96%igem Alkohol zeigten, daß auf diesen Zugstraßen die Reaktion am längsten zu erhalten ist, besonders in den Palisadenzellen über den Nebennerven, in den Leitbündelscheiden und den stomatanahen Zellen des unteren Assimilationsparenchyms.

Oft konnte eine „Schwerpunktbildung" in der Aktivität einzelner Zellen beobachtet werden, besonders bei Palisadenzellen, in denen eine kompakte Dunkelfärbung des Plasmas am unteren Pol der Zelle auftritt. Sie liegt in einer ganzen Gruppe von Palisadenzellen örtlich eigentümlich gleichmäßig und darf wohl so gedeutet werden, daß an einem Zellende konzentriert ablaufende Dephosphorylierungsprozesse einer gerichteten Weitergabe der Kohlenhydrate dienen. Auch in Richtung auf ein Leitbündel sich anschließende Zellen sind aktiver als die umgebenden Mesophyllzellen. Ähnliches scheint die fast ausschließlich „polare" Anfärbung von Schwammparenchymzellen hervorzurufen. Die Protoplasten sind nur dort geschwärzt, wo sie der Diffusionsfläche zur Nachbarzelle anliegen; besonders auffällig in längere Zeit verdunkelten Blättern, deren Betriebsstoffwechsel auf die Reaktivierung im Schwammparenchym eingelagerter Stärke angewiesen ist. Im Palisadenparenchym ist die Aktivität äußerst gering, nur ganz kleine, den Chloroplasten aufliegende schwarze Punkte sind die Reaktion.

Seltener, am häufigsten jedoch in längere Zeit verdunkelten und dann wieder belichteten jungen Blättern trat eine granuläre Schwärzung der Chloroplasten auf. Als statt des Acetatpuffers ein Phosphatpuffer pH 6 (20) dem Fixierungsmittel zugesetzt wurde, ließ sich diese Reaktion häufiger reproduzieren. Geschwärzt werden die in fixierten Chloroplasten erkennbaren helleren, kavernenartigen Bezirke, durch welche die Plasten granulär strukturiert erscheinen. Abbildung 4 stammt von Versuchen, die unter den gleichen Bedingungen an *Hibiscus* vorgenommen wurden, dessen Chloroplasten diese

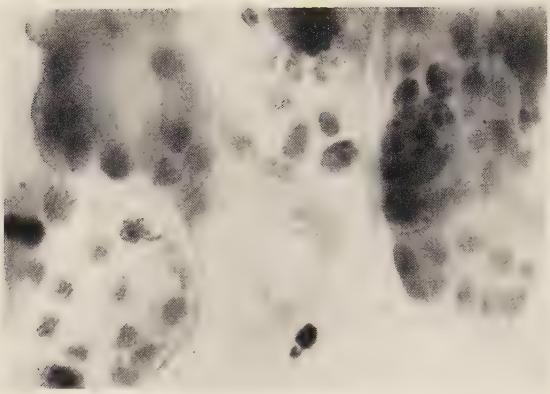


Abb. 4. Zahlreiche granulär geschwärzte Chloroplasten in den Palisaden eines Hibiscusblattes. Mitte oben und Mitte der linken Zellwand der äußersten Zelle rechts: zwei große, fleckig gefärbte Zellkerne

Struktur besonders gut zeigen. Kontrollversuche ergaben keine Reaktion, so daß eine Fällung von aus der Fixierungsflüssigkeit stammenden Phosphaten ausgeschlossen ist. Es erscheint bemerkenswert, daß die Reaktion allein durch die Änderung der Fixage beeinflußbar ist; wahrscheinlich werden besonders labile Strukturen der Chloroplasten bei diesem pH-Wert besser konserviert; aber noch ein anderes Moment muß berücksichtigt werden, das mit der Schwärzung der Gefäße in den Blattnerven gegeben ist.

Diese Reaktion erfaßt die Nebennerven, aber auch den Medianus, und hier besonders die Xylemprimanen und scheint hauptsächlich in einer Schwärzung der Tüpfel (Abb. 5) zu bestehen. Soweit es sich hierbei um ein Gefäß handelt, das von einer Parenchymzelle begleitet wird, erscheint eine Phosphataseaktivität an diesen Membranen im Zusammenhang mit einem Phosphorsäurekreislauf Mesophyll—Phloem—Xylem—Mesophyll denkbar. Ebenso könnte an eine Aktivität der Phosphatase in Verbindung mit Resorptionsprozessen gedacht werden, welche die im Transpirationsstrom befindlichen Zucker betreffen; hiermit könnte die starke Reaktion der Xylemprimanen, die im entfaltenden Blatt trophische Funktion haben, zusammenhängen.

Auch aus eigenen Beobachtungen der Wirkung von Kälte auf *Citrus* kann geschlossen werden, daß den Xylemprimanen enzymatisch besonders aktive Zellen anliegen. Nach Frostungen wurde eine auffällige Neigung der Holzprimanen zu gummoser Infiltration festgestellt (vgl. auch GASSNER 10). Die tropfenförmige Infiltration der Primanen geht von den parenchymatischen Belegzellen aus, deren Enzymgarnitur, durch die Frostung aktiviert, die gummose Degenerierung der Membranen bewirkt. Auch SORAUER (29) beschreibt bei der Kirsche eine derartige Reaktion auf künstliche Frostungen. Eine phosphatatische Aktivität im Bereich dieser Zellen wäre also nichts Überraschendes, sie wäre schon aus ihrer Lage einerseits zum reservestoffspeichernden Mark und andererseits zu den Markstrahlen verständlich. Eine Aktivität der Holzparenchymzellen beschreibt ZIEGLER (33) und setzt sie zu der Aktivierung der im Holzparenchym eingelagerten Reservestärke in Beziehung.

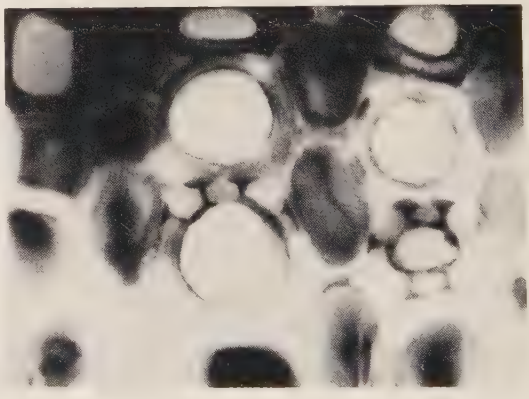


Abb. 5. Reaktion der Xylemprimanen (oben) des Medianus, der Markstrahlen und der Gefäßtüpfel

Bedenklich ist, daß auch Membranen zwischen zwei Gefäßen gefärbt werden (Abb. 5). Es ist unwahrscheinlich, daß es sich dabei um Restplasma handelt, das über die Tüpfel durch feinste Plasmabrücken noch mit dem Holzparenchym oder dem Markstrahl verbunden ist, wie es vielleicht die Abbildung zulassen würde. ZIEGLER (34) nimmt an, daß es sich bei der Gefäßschwärzung um Phosphate handelt, die sich „in adsorptiver Bindung an den Gefäßmembranen" befinden und „die chemische Bindung der in der Brutlösung befindlichen Bleiionen verursachen"; erhebliche Mengen von Phosphaten konnten von ihm mittels Durchspülens von Stammzylindern gewonnen und nachgewiesen werden.

Die Existenz „einer Art Salzkonzentrationspuffer der Gefäßmembranen" ist denkbar, jedoch kann die Vorstellung ZIEGLERS in dieser Form nicht übernommen werden, da dann auch Membranschwärzungen in Kontrollversuchen mit substratfreier Brutlösung zu erwarten sind; diese treten aber nicht auf. Erst die Gegenwart eines von der Phosphatase dephosphorylierbaren Substrates läßt die Reaktion zustande kommen. Sollten die von ZIEGLER dafür verantwortlich gemachten Phosphate die Reaktion veranlassen, müßten sie aus esterähnlicher Bindung an die Gefäßwände enzymatisch freigesetzt sein. Eine vorausgehende Aktivierung am Brutsubstrat und die Diffusion des Enzyms von besonders aktiven Geweben, wie etwa dem nahen Scheidenparenchym, ist anzunehmen. Diese Unspezifität der Phosphatase, die nach ITO et al. (17) für die Süßkartoffel zutreffen soll, könnte schon durch die Denaturierung ihres Apofermentes bei der Fixage erwartet werden. Es liegt nahe, anzunehmen, daß durch sie auch zelleigene Phosphate freigesetzt und zur Reaktion gebracht werden; bei der Reaktionsabänderung in den Chloroplasten durch unterschiedliche Pufferung der Fixierungsflüssigkeit könnte dieses eine Rolle spielen. Die verringerte Hydrolyse esterähnlich gebundener Phosphate bei höherem pH-Wert neben verringerter Lösungstension durch die schon bei der Fixage vorliegenden Phosphationen könnte in den Chloroplasten einen Verlust an Phosphaten verhindert haben, der bei einer Fixierung mit Acetat gepufferter Formaldehydlösung eintritt. Die Löslichkeit gewisser Proteine bei essigsaurer Fixierung mag dabei eine gewisse Rolle spielen. Die in den Chloroplasten nun aber verbliebenen Phosphate können von der unspezifisch alle möglichen Phosphorsäureester angreifenden Phosphatase für die Reaktion freigesetzt worden sein.

Im jungen, noch nicht voll ausdifferenzierten Blatt, dessen Mesophyll fast noch aus gleichwertigen Zellen besteht, herrscht allgemein eine starke phosphatatische Aktivität; ein auffälliger Gradient ist unter ihnen nicht festzustellen. Neben dieser starken Allgemeinreaktion sticht hier aber auch die Aktivität der Epidermiszellen gegen den Befund im ausdifferenzierten Blatt ab. Sie steht hier sicher mit dem erhöhten Baustoffwechsel der sich noch ausdifferenzierenden, nicht selbst assimilierenden Zellen im Zusammenhang. Die Baustoffe müssen aus dem Mesophyll bezogen werden und stehen in den Palisadenzellen wahrscheinlich als Zuckerphosphate zur Verfügung; ihre Dephosphorylierung in den Epidermiszellen schafft den zur Sicherung des Nach-

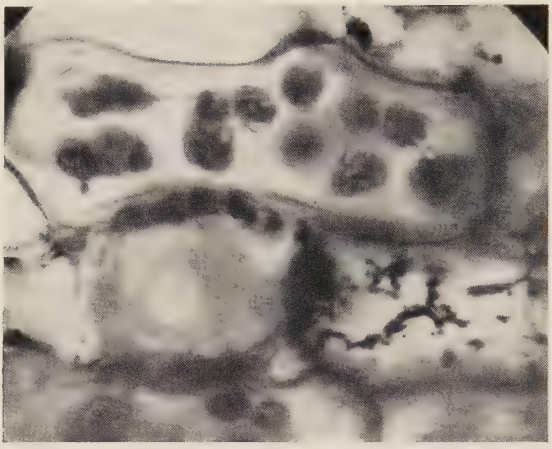


Abb. 6. Alternierende Reihen phosphatatisch aktiver, stärkefreier Schwammparenchymzellen und inaktiver, stärkespeichernder Zellen

strömens notwendigen Gradienten. Mit dem Abklingen des erhöhten Stoffwechsels reduziert sich auch in ihnen die Phosphataseaktivität.

Mit dem Beginn der endogenen Stärkeschoppung im Frühjahrsblatt verstärkt sich die Reaktion im Schwammparenchym. Es treten eigentümlich netzige Strukturen im Plasma auf, an denen noch dunkler gefärbte sphärische Körper aufgehängt scheinen, die möglicherweise Chondriosomen sind. Die Enzymaktivität schwindet in denjenigen Schwammparenchym-, aber auch Palisadenzellen, die nunmehr Stärke eingelagert haben (siehe auch BADENHUIZEN 4). Nur noch die stärkefreien Schwammparenchymzellen lassen dieses auffällige Netzmuster erkennen. Vermutlich fungieren einige Schwammparenchymzellen, die zunächst noch stärkefrei bleiben, als „Leitzellen" für den weiteren Antransport der Zucker zu den „Speicherzellen" (Abb. 6). Hierbei liefern wahrscheinlich Dephosphorylierungsprozesse die Energien für den Transport der Zucker gegen eine denkbar höhere Konzentration, die in den speichernden Schwammparenchymzellen zum Inganghalten einer Stärkesynthese, wie sie in dieser extremen Form bei der endogenen Stärkeschoppung auftritt, notwendig erscheint.

b) Die Variabilität der GOMORI-Reaktion

Ein Vergleich unter verschieden lange fixiertem Material gleicher Herkunft zeigt eine eigentümliche Veränderung in der Reaktion der Blattzellen. Die übliche Bebrütung von 10 bis 15 Minuten fixiertem Material erzielt eine Dunkelfärbung des Protoplasten der Palisaden, unter der man aber auch eine Anzahl sphärischer oder elliptischer Körper wahrnehmen kann, die tiefschwarz gefärbt sind und offenbar zum Chondriom gehören. In anderen Fällen sind nur die Chloroplasten und eine verschieden große Zahl dieser Körper gefärbt (Abb. 7). Dazwischen liegen einige Zellen, die durch eine sehr geringe Reaktion auffallen. In ihnen ist häufig ein hyaliner Zellkern zu finden, der von elliptischer, beiderseits zitzenförmig ausgezogener Gestalt ist. Er ist von mehreren schwarzen Warzen nahezu gleicher Größe bedeckt, die sich plastisch von seiner Oberfläche abheben. „Warzenkerne" aus Schwammparenchymzellen zeigt die Abbildung 8. In Kontrollversuchen konnten alle diese Schwärzungen nicht festgestellt werden.

In 10 bis 15 Stunden fixiertem Material ist die diffuse Dunkelfärbung der Protoplasten meist völlig verschwunden, es treten dafür in fast allen Zellen dunkle Kerne hervor (Abbildung 9); an einigen sind auch jetzt noch dunklere Warzen festzustellen (Abbildung 10). Mehrere schwarze Körper unterschiedlicher Größe und Form liegen meistens den Chloroplasten auf oder sind zwischen diesen gelagert (Abb.11). Andere Zellen besitzen nur Warzenkerne.

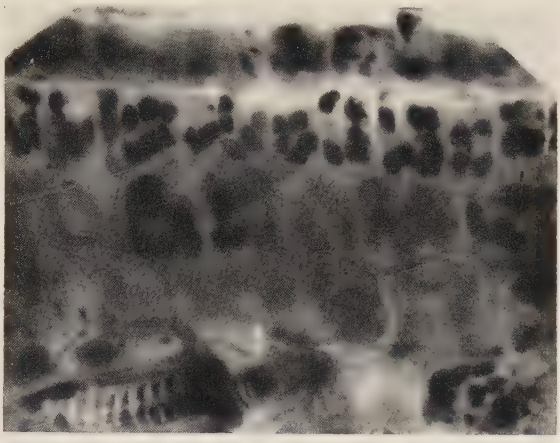


Abb. 7. 10 Min. Fixage: Chloroplasten der Palisadenzellen

An länger fixiertem Material aus voll ausdifferenzierten Blättern konnte weiterhin die Beobachtung gemacht werden, daß in den Epidermiszellen manchmal schwarze Kerne auftreten, während nach kurzer Fixierungszeit keinerlei phosphatatische Aktivität festzustellen ist. Es ist anzunehmen, daß der Reaktionswechsel auf Grund der Diffusion des Enzyms eintritt, das nach eventueller Zerstörung seiner Trägerstrukturen von den Kernen adsorbiert wird. Die Angaben von CHAYEN und NORRIS (6) über die Adsorption von DNS durch den Kern in Zellen, deren „cytoplasmatische Granula" bei der Fixierung zerstört wurden, sprechen für die Wahrscheinlichkeit dieser Annahme. Ob damit sämtlichen (im Sinne der Reaktion phosphatatisch aktiven) Kernen eine wirkliche Enzymaktivität oder adäquate Beteiligung abgesprochen werden muß, ist fraglich. Die hyalinen „Warzenkerne" schwach aktiver Zellen in nur kurz fixiertem Material lassen vermuten, daß in ihnen ein in vivo tatsächlich vorhandener Zustand der Enzymaktivität fixiert wurde. Weitere Beobachtungen, die (im Reaktionssinne) phosphatatisch aktive Kernextrusionen wahrscheinlich machen, der häufig zu findende krasse Un-

Abb. 8. Hyaline Warzenkerne

terschied in der Reaktionsstärke benachbarter Zellen sowie der Zustand der darin gefundenen Kerne lassen es vielleicht zu, eine Kern-Plasma-Relation im enzymatischen Rhythmus der Zelle zu sehen. So würde etwa das „Warzenkernstadium" jenen Zustand einleiten, der in kurz fixiertem Material mit allgemeiner Dunkelfärbung des Protoplasten der Palisadenzellen oder deren Plastiden reagiert und der durch ein „Eingreifen" des Kernes stimuliert sein könnte. Dieses ließe eine unterschiedliche Neigung des Kernes zur Anfärbung nach verlängerter Fixierung verständlich erscheinen, da seine Adsorptionsfähigkeit für eine plasmatische Komponente in dieser Zeit, durch die schon in ihm vorliegende Menge einer an das Plasma abzugebenden Komponente der Enzymaktivität, bestimmt sein könnte.

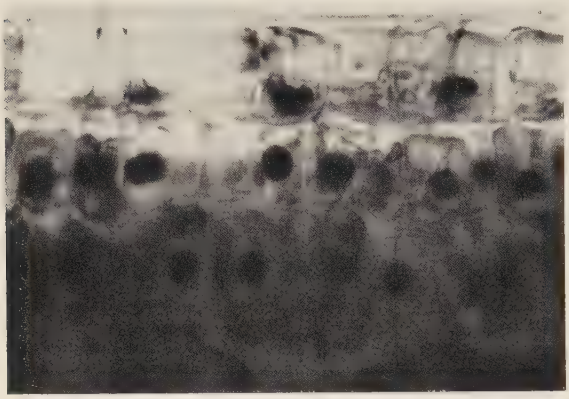


Abb. 9. 10 Std. Fixage: Kerne der Palisadenzellen

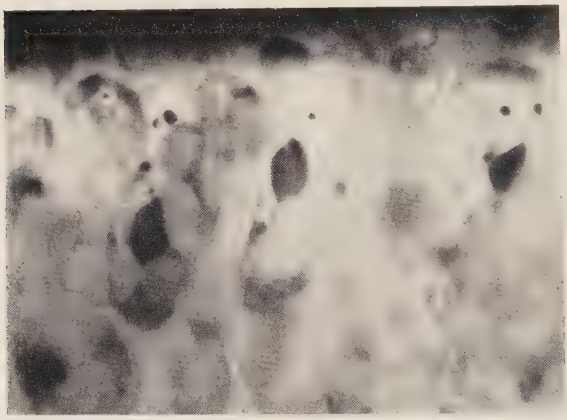


Abb. 10. Warzenkerne und sphärische Körper

Die wenigen Kernschwärzungen in der Epidermis älterer Blätter deuten in die gleiche Richtung. Die phosphatatische Aktivität ausdifferenzierter Epidermiszellen ist offenbar sehr gering. Nur noch einige Zellen scheinen etwas aktiver zu sein; sie ergeben nach kurzer Fixierung aber nur geringe diffuse oder granuläre, sich leicht der Beobachtung entziehende Schwärzungen. Erst nach Konzentration auf den Kern, der durch die Aktivität der Zelle in seiner Adsorptionsfähigkeit verändert wurde, wird die Enzymtätigkeit der Zelle beobachtbar. Eine derartige Neigung des Kernes muß angenommen werden, denn setzt man eine Diffusion des Enzymes über seine Ursprungszellen, in diesem Falle die Palisaden, voraus, läßt sich die vereinzelte Anfärbung der Epidermiskerne mit einer Diffusion allein nicht erklären, da hierfür allen die gleichen Vorbedingungen gegeben sind.

c) Die Reaktion in Schnitten gelbnerviger Blätter

Eine starke Schwärzung der assimilatleitenden Zellen, wie die Durchlaßstreifen, die Markstrahlen, das Phloem und die Bündelscheiden, läßt auf eine erhöhte Aktivität der Phosphatase im Blatt schließen. Zum späteren Zeit-

punkt zeigt sich eine gegenüber dem normalen Blatt verstärkte Anfärbung des Plasmas aller parenchymatischen Zellen und deren Membranen (Abb. 12). Mit den Abbildungen 11 und 12 wird die unterschiedliche Reaktion zwischen einem normalen (Abb. 11) und einem gelbnervigen Blatt einander gegenübergestellt. Das Untersuchungsmaterial aus beiden Blättern wurde von der Fixierung bis zur Visualisation in einem Arbeitsgang durchgezogen, so daß hierfür absolut gleiche Voraussetzungen vorliegen. Neben der auffälligen Membranschwärzung der Zellen des gelbnervigen Blattes sind in ihnen globuläre Partikeln sowie Plasmabezirke um zusammengeballt liegende Stärkekörner gefärbt. Es fehlen die im normalen Blatt zu beobachtenden schwarzen Kerne.

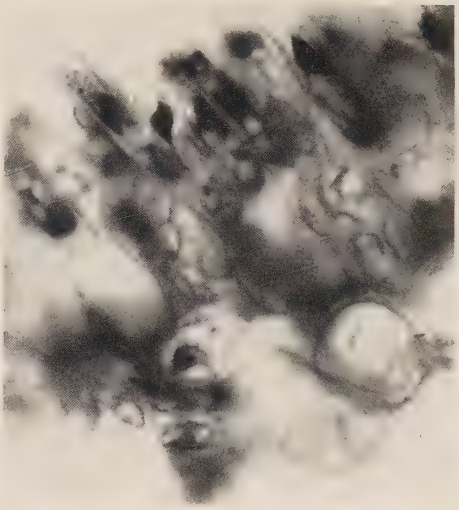


Abb. 11. Normalblatt

In den voll entwickelten Blättern tritt mit dem Fortschreiten der Stärkeschoppung die phosphatatische Aktivität auch in den Epidermiszellen wieder auf, welche die Deponierung jener Stärke vornehmen, die für das durch Ringelung gelbnervig gewordene Blatt so charakteristisch ist. Nach einiger Zeit erlischt auch diese Enzymtätigkeit wieder. Das Wiederauftreten und erneute Schwinden der Reaktion in der Epidermis bei Fortbestehen einer starken Reaktion im Mesophyll sowie die verringerte Tendenz zur Anfärbung von Mesophyllkernen läßt auf eine besondere Adsorptionsneigung des Kernes bei gesteigerter Enzymtätigkeit seiner Zelle schließen.

Abb. 12. Gelbnerviges Blatt

Die starke Allgemeinschwärzung, die neben den zu Partikeln meist globulärer Form aufzulösenden Fällungen insbesondere durch Membranfärbung zustande zu kommen scheint, läßt vermuten, daß es sich bei dieser, ähnlich wie bei der Membranfärbung der Gefäße, um „unspezifisch" freigesetzte zelleigene Phosphate handelt. Die Mesophyllzellen gelbnerviger Blätter verfügen

offenbar über mehr dieser Art Phosphate als das normale Blatt, da in ihnen durch die Behinderung des Assimilattransportes und den damit erzeugten Rückstau ein normalerweise vorhandener Gradient verlorenging; hierdurch wurde eine normale Umsetzung der Phosphate verhindert. Die zunächst noch fortlaufende Assimilationstätigkeit wird weiterhin Zuckerphosphate synthetisiert haben, wobei das zur Phosphorylierung benötigte anorganische Phosphat vornehmlich aus dem Transpirationsstrom (und von den als „Salzkonzentrationspuffer" wirkenden Gefäßmembranen [ZIEGLER]) bezogen wurde. Beim nachfolgenden Aufstocken der Kohlenhydrate zur Stärke kam es durch Wiederfreisetzung der Phosphorsäure zur Phosphatanreicherung in den von der Stärkeschoppung betroffenen Zellen. Vermutlich konnten hierbei nicht alle Phosphate auf die normalerweise dafür bereitstehenden Akzeptoren übertragen werden und wurden darum auch anderweitig verestert. Dieser Anteil könnte durch das „unspezifische" Ferment zur Reaktion gebracht sein und die starke Schwärzung der Mesophyllzellen im gelbnervigen Blatt verantworten.

Abschließende Betrachtung

Die Befunde bei Untersuchung der Phosphatase lassen eine ungewöhnliche Speicherung von Phosphaten in den Blattzellen vermuten, so daß vielleicht auch eine Störung des Phosphorsäurespiegels an der Prägung der Gelbnervigkeit beteiligt sein könnte. Jedoch läßt die Problematik der aus dem Phosphatasenachweis sich neu ergebenden Fragen diesen indirekt erhaltenen Beitrag zur Physiologie der Gelbnervigkeit nur bedingt zu.

Schon allein die Frage, wo eine wirklich „spezifische" Phosphatasereaktion vorliegt, die der Enzymaktivität der lebenden Zelle im Augenblick der Fixierung entspricht, bleibt offen. Nach der Definition eines Holoenzymes, die nach ALBERS et al. (2) und ALBERS (1) auch für die Phosphatase zutrifft, müßte es dort sein, wo Apo- und Co-Enzym (vom Kern und vom Chondriom geliefert) gebunden vorliegen. Die den Chloroplasten aufliegenden oder zwischen diesen gruppierten sphärischen Körper (Abb. 10, 11) könnten dafür in Betracht kommen. Sie behalten mit den Kernen die Reaktionsbereitschaft nach längerer Fixage am dauerhaftesten, wodurch gewissermaßen ihre Affinität zu einem vom Kern produzierten Stoff bekundet wird. Er reichert sich in einem vermutlichen Rhythmus der Enzymaktivität der Zelle im Kern an, wird an das Plasma abgegeben (Kernextrusion?) und könnte die Kernschwärzungen verursachen, da diffuse plasmatische Enzymteile (nach Zerstörung plasmatischer Granula) bevorzugt durch ihn adsorbiert werden. Diffuse Schwärzungen, auch die der Membranen, gingen dann auf das Konto des durch die Fixage diffus verteilten, in der lebenden Zelle nicht aktiven Enzymteils. Dieser in der Reaktion „wildernde" Teil entbindet vielleicht zelleigene Phosphate, die, wie es etwa die stark diffuse „polare" Schwärzung der Palisaden vermuten läßt, durchaus auch am phosphatatisch katalysierten Umsatz oder Transport von Kohlenhydraten — besonders in „Stoßzeiten" — beteiligt sind. Hierdurch wäre nicht nur eine im Augenblick der Fixierung wirksame Phosphataseaktivität visualisiert worden, sondern darüber hinaus ein gewisser Abschnitt des davor ablaufenden Phosphorsäureumsatzes. Ein solcher Abschnitt — zeitlich und örtlich begrenzt — scheint sich in der netzigen Struktur von Schwammparenchymzellen bei der endogenen Stärkeschoppung fixiert zu haben und — für einen noch größeren, pathologisch übersteigerten Abschnitt — in der starken Allgemeinschwärzung des Mesophylls gelbnerviger Blätter. Auch die Bildung von „Zugstraßen" der Assimilate geht vielleicht zu einem gewissen Teil mit auf dieses Moment zurück.

Zweifellos ist die Phosphatase wesentlich an Prozessen beteiligt, die aktiv den Assimilattransport in den Mesophyllzellen bewirken (siehe auch WANNER

31). Derart enzymatisch katalysierte, energiebedürftige Prozesse der Assimilatleitung mögen bei tiefgepflanzten Citrusbäumen inhibiert sein. Der hierdurch eingeschränkte oder völlig zum Erliegen gebrachte Saftfluß ergibt eine Stärkeschoppung, welche die „Gelbnervigkeit" auslöst.

Zusammenfassung

Die Blattanatomie von *Citrus aurantium sinensis* und sich hierbei ergebende physiologische Gesichtspunkte werden beschrieben; auf eine ausgeprägte jahreszeitliche Stärkeschoppung wird hingewiesen.

Die Gelbnervigkeit ist, besonders zu dieser Zeit, durch Ringelung des Sprosses reproduzierbar. Medianusdurchtrennung ist unter normalen Kulturbedingungen ohne Erfolg.

Die abnorme Schoppung von Stärke, besonders in der Epidermis, und die Steiltracht des gelbnervigen Blattes werden dargelegt.

Durch unterschiedlich lange Beleuchtung mehrerer Versuchsgruppen während des Winters wird die Abhängigkeit der Symptombildung von einer gesteigerten Assimilation und Stärkeschoppung belegt: geringelte Dauerlichtpflanzen prägen das Symptom in kürzester Zeit, geringelte Normallichtpflanzen erst im Frühjahr und geringelte Pflanzen mit nur 4 Stunden Tageslicht nie (jedoch nach Überbringung in Dauerlicht oder volles Tageslicht). Blätter mit durchtrenntem Medianus bilden im Dauerlicht das Symptom aus.

Die Symptombildung eines am ungeringelten Zweig, in unmittelbarer Nähe der warmen Leuchtstoffröhren gewachsenen Blattes läßt vermuten, daß pathologisch gesteigerte Atmungsvorgänge bei der Bildung der Nervchlorose ausschlaggebend beteiligt sind.

Regenerationsversuche durch Verdunkelung gelbnerviger Blätter lassen keine eindeutige Aussage zu, jedoch scheint eine Neubildung von Chlorophyll im Anfangsstadium der Krankheit nicht ausgeschlossen.

Infiltrationsversuche zeigen einen anomalen Verschluß der Stomata gelbnerviger Blätter.

Aus dem gelbnervigen Altersblatt ist die Stärke fast völlig verschwunden.

Die abnorme Stärkeschoppung (gesteigerte Atmung), der Spaltenschluß (O_2-Mangel) und die Steiltracht (Störung des Ionenantagonismus) werden mutmaßlich verknüpft. Mit den aus der Blattanatomie abgeleiteten Eigenheiten wird die primäre Wirkung der pathologischen Entwicklung auf den Medianus begründet.

Die Reaktion auf den Phosphatasenachweis wird beschrieben, eine „granuläre" Schwärzung von Chloroplasten beobachtet. Reaktionsänderungen bei unterschiedlicher Fixierung, besonders die Kernfärbungen werden kritisch diskutiert. Die Schwärzung von Gefäßen läßt die Beteiligung zelleigener Phosphate an der Reaktion vermuten. Sie scheinen für die starke Schwärzung des Plasmas und der Membranen im gelbnervigen Blatt verantwortlich zu sein. Es wird angenommen, daß sie durch den Verlust eines entsprechenden Gradienten als Folge des Assimilatstaus zusammen mit der Stärke in den Mesophyllzellen geschoppt wurden.

Ein „aktiver" Transport von Kohlenhydraten, an denen die Phosphatase beteiligt ist, wird für wahrscheinlich gehalten. Eine durch Sauerstoffmangel im tiefgepflanzten Stammteil bewirkte Einschränkung derartiger Aktivität wird als der zur Gelbnervigkeit entwickelnde Faktor angesehen.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. J. BOGEN, möchte ich für die Anregungen und die stete Förderung der Arbeit aufrichtig danken. Ich gedenke hier auch meines verstorbenen Lehrers, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. G. GASSNER, dem ich dieses interessante Thema verdanke.

Summary

Investigations of "vein chlorosis" in orange leaves

The leaf anatomy of *Citrus aurantium sinensis* and the physiological viewpoint emerging from it are described; a marked seasonal accumulation of starch is pointed to

Nerve chlorosis can, particularly at this time of year, be reproduced by ringing the shoot. Cutting the median nerve is under normal conditions of cultivation without effect.

The abnormal accumulation of starch, particularly in the epidermis, and the erect position of the affected leaves is described.

By varying lengths of illumination in the winter in a number of experimental series the symptoms were shown to be the result of increased assimilation and starch accumulation; ringed plants in continuous light display symptoms in the shortest time, ringed plants in normal light show them only in spring and ringed plants in a four-hour day show no symptoms (symptoms develop however if these plants are transferred to continuous light or normal daylight). Leaves in which the median vein has been cut develop symptoms in continuous light.

The formation of symptoms in an unringed shoot growing in the immediate vicinity of the warm incandescent tubes suggests that pathologically intensified respiration processes play an essential part in the formation of the vein chlorosis.

Regeneration experiments made by growing chlorotic leaves in the dark led to no definite conclusions but the possibility of chlorophyll being reformed in the early stages of the disease seems not to be entirely excluded.

Infiltration experiments indicate an abnormal closure of the stomata of chlorotic leaves.

In old leaves suffering from vein chlorosis the starch has almost completely disappeared.

The abnormal starch accumulation (intensified respiration), the closure of the stomata (O_2 deficiency) and the erect leaf position (disturbance of ion antagonism) are presumably related.

The reaction to the phosphatase test is described and a "granular" blackening of the chloroplasts was observed. Changes of reaction from different methods of fixation, particularly in nuclear staining, are discussed critic-

ally. The blackening of the vessels suggests that phosphates in the cells are involved in the reactions. They appear to be responsible for the intense blackening of the protoplasm and the membranes in the leaves suffering from vein chlorosis. It is assumed that they accumulate together with the starch in the mesophyll cells as a result of the loss of a proper gradient consequent on the damming up of the assimilates.

An "active" transportation of carbohydrates, in which phosphatase is involved, is thought probable. A reduction of this activity in the deep planted orange-trees, resulting from oxygen deficiency, is rearded as the factor causing the development of vein chlorosis.

Literaturverzeichnis

1. Albers, D., 1940: Beeinflussung der Phosphatase verschiedenen Reinheitsgrades durch UV- und Röntgenstrahlen. Biochem. Z. **306**, 143.
2. Albers, H., E. Beyer, A. Bohnenkamp und G. Müller, 1938: Über die zusammengesetzte Natur der Fermente. I. Mitt. Zur Kenntnis der Phosphatasen. Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1913.
3. Alten, F., Goeze und H. Fischer, 1937: Kohlensäureassimilation und Stickstoffhaushalt bei gestaffelter Kaligabe. Z. Bodenkde. u. Pflanzenern. **5**, 259—289.
4. Badenhuizen, N. P., 1955: Distribution of Acid Phosphatase and Phosphorylase in Relation to Starch Production. Acta Bot. Neerl. **4** (4).
5. Chapman, H. D., G. F. Liebig and A. P. Vanselow, 1939: Some Nutritional Relationships ... on *Citrus*. Proc. Soil Sci. Soc. America **4**, 196—200.
6. Chayen, J., and K. P. Norris, 1953: Cytoplasmic Localization of Nucleic Acids in Plant Cells. Nature **171**, 472—473.
7. Costa, A. S., e T. J. Grant, 1949: Investigaçõnes sôbre a Tristeza dos *Citrus*. Bragantia **9**, 1—4.
8. Fawcett, H. S., 1936: *Citrus* Diseases and their Control. II. Ed. New York and London.
9. Gassner, G., 1940: Untersuchungen über das *Citrus*-Sterben von Dörtyol oder die Gelbnervigkeit der *Citrus*-Bäume. Phytopath. Z. **13**, 97—125.
10. — —, 1940: Untersuchungen über das „Mal secco" oder das „Kurutan" der Limon-Bäume. Phytopath. Z. **13**, 1—90.
11. — —, und G. Goeze, 1934: Assimilationsverhalten, Chlorophyllgehalt und Transpirationsgröße von Getreideblättern mit besonderer Berücksichtigung der Kalium- und Stickstoffernährung. Z. Bot. **27**, 255—340.
12. Gomori, G., 1941: Distribution of Acid Phosphatase in the Tissues under Normal and Pathologic Conditions. Arch. Path. **32**, 189—199 u. a. (1939—1948), Ref. Mikroskopie (Wien) **6**, 15—22 (1951).
13. Grant, T. J., A. S. Costa, H. C. Mendes, J. E. de Paiva Neto e Renato Catáni, 1950: Investigações sôbre a Tristeza dos *Citrus*. VI. Alguns estudos fisiológicos sôbre a molestia. Bragantia **10**, 49—59.
14. v. Guttenberg, H., 1902: Zur Entwicklungsgeschichte der Krystallzellen im Blatte von *Citrus*. Sitz. Ber. Math.-Naturw. Kl. Akad. Wiss. Wien **111**, Abt. 1, 855—872.
15. Haas, A. R. C., 1932: Some Nutritional Aspects in Mottle-Leaf and other Physiological Diseases of *Citrus*. Hilgardia 483—559.
16. Heath, O. V. S., 1951: Studies in Stomatal Behaviour. V. The Role of Carbon Dioxyde in the Light Response of Stomata. J. Exp. Bot. **1**, 29—62.

17. Ito, E., S. Kondo and S. Watanabe, 1955: Studies on Sweet Potato Phosphatase. I. Specifity. J. Biochem. (Tokyo) **42**, 793—803, Ref.: Ber. wiss. Biol. **108**, 189 (1957).

18. Janke, A., 1946: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, I. 295. Th, Steinkopf, Dresden u. Leipzig.

19. Kursanov, A. L., 1952: Die Bewegung der organischen Substanzen in der Pflanze Bot. Ž. **37**, 585—593 (russ.) u. a., Zit. in Fortschr. Bot. **17** (1955), ref. in Ber. wiss. Biol. **82**, 63 (1953), **85**, 173 (1953), **98**, 50 f. (1955).

20. Küster, Thiel und Fischbeck, 1951: Logarithmische Rechentafeln, S. 157, Walter de Gruyter u. Co., Berlin.

21. Maiwald, K., 1923: Wirkung starker Nährstoffgaben auf den Assimilationsapparat. Angew. Bot. **5**, 72.

22. Petri, L., 1930: Ulteriori ricerchi sulla morfologia della *Deuterophoma tracheiphila*. Bol. R. Staz. Pat. Veget. di Roma **X**, N. S., 191—221.

23. Reed, H. S., 1946: Effects of Zinc Deficiency on Phosphate Metabolism of the Tomato Plant. Am. J. Bot. **33**, 778.

24. — —, and J. Dufrenoy, 1935: The Effects of Zinc and Iron Salts on the Cell Strukture of Mottled Orange Leaves. Hilgardia **9**, 113—141.

25. Schulze, H., 1902: Beiträge zur Blattanatomie der Rutaceen. Beih. Bot. Zbl. **12**, 55—98.

26. Sieck, W., 1895: Schizolysigene Sekretbehälter. Pringsh. Jhrb. **27**, 208—225.

27. Smith, P. F., and W. Reuther, 1950: Seasonal Changes in Valencia Orange Trees. I. Changes in Leaf Dry Weight, Ash, and Macronutrient Elements. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. **55**, 61—72.

28. — —, — — and A. W. Specht, 1952: Seasonal Changes ... II. Changes in Microelements, Sodium, and Carbohydrates in Leaves. Ibid. **59**, 31—35.

29. Sorauer, P., 1906: Experimentelle Studien über die mechanischen Wirkungen des Frostes bei Obst- und Waldbäumen. Landw. Jb. **35**, 469—526.

30. Sumner, J. B., and K. Myrbäck, 1950: The Enzymes, I/1, 484 ff. Acad. Press Inc. New York.

31. Wanner, H., 1952: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta **41**, 190—194.

32. Willenbrink, J., 1957: Über die Hemmung des Stofftransportes in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme. Planta **48**, 269—342.

33. Ziegler, H., 1955: Über die Lokalisierung der sauren Phosphatase im Holz des Spitzahorns. Naturwissenschaften **42**, 260.

34. — —, 1956: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta **47**, 447—500.

35. — —, 1956: Über den Gaswechsel verholzter Achsen. Flora **144**, 229—250.

Aus dem Institut für Forstbotanik, Eberswalde

Enzymausscheidung und Holzabbau durch *Phellinus igniarius* Quél. und *Collybia velutipes* Curt.

Von

H. Lyr und H. Ziegler

unter Mitarbeit von Ch. Heffe

Mit 9 Abbildungen

Über das Vorkommen von Enzymen bei holzzerstörenden Pilzen liegt in der älteren Literatur eine Reihe von Angaben vor. Eine Zusammenstellung der Arbeiten bis zum Jahre 1937 findet sich bei Garren (1938) und Bose (1939). Neue Arbeiten befassen sich vorwiegend mit den Eigenschaften einzelner Enzyme, von denen besonders die Oxydasen und Peroxydasen (Literatur s. Lyr 1956 und Fahraeus 1958) sowie die Cellulasen (vgl. Norkrans 1957) eingehender studiert wurden.

Die älteren Angaben können wegen der oft unzureichenden methodischen Handhabung der Nachweisverfahren und wegen der teilweise unklaren Abgrenzung der einzelnen Enzyme nur sehr bedingt verwendet werden. Wie sich am Beispiel der Peroxydase gezeigt hat, sind einige Angaben offenbar falsch und bedürfen einer Überprüfung. Hinzu kommt, daß der Enzymnachweis an Myzelextrakten unterschiedlicher Herkunft und Vorbehandlung vorgenommen und auf eine Trennung von intra- und extrazellulären Enzymen kein Wert gelegt wurde. Da die meisten Befunde nur stichprobenartigen Charakter haben, läßt sich aus ihnen nichts über den zeitlichen Verlauf der Enzymbildung während des Pilzwachstums entnehmen. Eine Ausnahme machen nur die Untersuchungen von Bose und Sarkar (1937), die intra- und extrazelluläre Enzyme von einigen holzzerstörenden Pilzen getrennt nachwiesen und auch verschiedene Altersphasen des Myzels berücksichtigten. Da jedoch die Pilze auf Malzextrakt kultiviert wurden, lassen sich daraus noch keine Schlüsse auf das Vorkommen und die Ausscheidung der Enzyme während des Holzabbaues ziehen, da bekanntlich viele Enzyme adaptiv gebildet werden.

Auch über den Abbau der Holzsubstanz durch holzzerstörende Pilze sind bereits mehrere Untersuchungen durchgeführt worden Falck (1926, 1927), Campbell (1930, 1931, 1932), Lindeberg (1944, 1946), Fahraeus,

Nilsson und Nilsson (1949), Stöckli (1952), Higuchi, Kawamura und Kawamura (1955) u. a. m. In keiner der Arbeiten finden sich jedoch Angaben über die am Abbau beteiligten Enzyme und der zeitliche Verlauf des Holzabbaues ist nur von einigen Autoren verfolgt worden. (Vgl. auch die zusammenfassende Darstellung von Rypáček 1957).

Es war daher das Ziel unserer Arbeit, Aussagen über Qualität und Quantität der Enzymausscheidung während der Holzzersetzung zu machen und parallel dazu den zeitlichen Verlauf des Holzabbaues zu untersuchen. Die beiden Pilzarten sind mit Bedacht ausgewählt worden. *Phellinus igniarius* bildet reichlich Peroxydase (Lyr 1956) und in geringem Umfange auch Laccase (Lyr 1958 a), während *Collybia velutipes* ein variables Bildungsvermögen für Laccase besitzt, deren Synthese durch gewisse Eingriffe induziert werden kann (Lyr 1958 b). Da diesen Enzymen möglicherweise eine Bedeutung für den Ligninabbau zukommt, war es von Interesse, ihr Auftreten während des Holzabbaues zu beobachten.

Aus arbeitstechnischen Gründen mußten sich die Untersuchungen auf die extrazellulären Enzyme beschränken, obwohl es auch von Bedeutung wäre, Aufschlüsse über das Auftreten spezifischer intrazellulärer Enzyme zu erhalten.

I. Methodik

Wie Versuche ergeben haben, wird Buchenholz von den beiden Pilzarten am besten verwertet. Daher wurden die Versuche ausschließlich mit dem Holz der Rotbuche (*Fagus silvatica*) durchgeführt, das von einem jüngeren Baum (25 cm ϕ) gewonnen wurde.

0,1 %	Asparagin
0,1 %	Pepton
0,2 %	$CaCO_3$
0,005 %	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,015 %	KH_2PO_4
0,010 %	K_2HPO_4
0,1 γ	Thiamin/ml

200-ml-Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 8 g lufttrockenem (= 7,04 g absolut trockenem) Buchenholz beschickt, das mäßig fein gemahlen und auf eine mittlere Korngröße gesiebt worden war. Die Kolben erhielten außerdem je 40 ml einer Nährlösung nebenstehender Zusammensetzung. Die Sterilisation wurde in der üblichen Weise im Dampftopf vorgenommen.

Die Nährlösung sollte vor allem die Stickstoffversorgung der Pilze sicherstellen und zugleich für eine genügende Pufferung sorgen, um ein zu starkes Absinken des pH-Wertes während des Versuches zu verhindern. Da höhere Phosphatkonzentrationen den BAS-Test stören, wurde nur wenig Phosphat zugesetzt. Die Beimpfung erfolgte durch Myzel-Aufschwemmungen (*C. velutipes*) und durch Impfstücke (*Ph. igniarius*). Zur Gewinnung der extrazellulären Enzyme wurden Holz und Myzel schonend mit destilliertem Wasser, unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe infiltriert (je Kolben einmal mit 30 ml und viermal mit 15 ml Aqua dest.), die Extrakte von je 10 Kolben eines Pilzes vereinigt und auf 900 ml aufgefüllt. Der dadurch erreichte Verdünnungsfaktor beträgt etwa 3,0, wenn man etwa 30 ml bewegliches Wasser je Kolben zugrunde legt.

Eine quantitative Extraktion der Enzyme läßt sich auf diesem Wege freilich nicht erreichen, da das mit Pilzhyphen durchwachsene Holz dem Extraktionsmittel schwer zugänglich ist und auch die Adsorption an die große Oberfläche dieses Systems von Bedeutung ist. Da stärkere Eingriffe aber die Pilzhyphen zerstören und somit keine Unterscheidung zwischen intra- und extrazellulären Enzymen ermöglichen, erschien dieses Verfahren hinlänglich geeignet, zumindest vergleichbare Werte zu liefern. Als Maß für eine schonende Behandlung wurde der Katalasegehalt der Extrakte benutzt, der sich normalerweise als außerordentlich gering erwies, bei gröberen Eingriffen aber stark anstieg.

Die Kulturen wurden in einem thermokonstanten Raum bei 25 °C und schwachem Lampenlicht aufbewahrt. Um den Wasserverlust auszugleichen, erhielten die Kolben nach 57 Tagen noch einmal 10 ml destilliertes Wasser (I). Da *Collybia velutipes* nach anfänglich gutem Wachstum später im Wachstum nachzulassen begann, wurden den Kulturen dieses Pilzes nach 86 Tagen 3 ml einer Vitaminlösung (II) nebenstehender Zusammensetzung und nach 121 Tagen noch 3 ml einer 0,5%igen Bakteriozymlösung (Präparat der Firma Zyma-Blaes-AG, München) (III) zugesetzt.

15,0 γ/ml Thiamin
0,6 γ/ml Laktoflavin
6,0 γ/ml Nikotinsäureamid
0,6 γ/ml Adermin
0,9 γ/ml Ca-Pantothenat

Zur Auswertung wurden die Inhalte und Extrakte von jeweils 10 Kolben vereinigt und gemeinsam analysiert. Als Kontrollen dienten völlig gleich behandelte, aber nicht beimpfte Kolben.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Aktivitätsbestimmungen wurden unmittelbar nach der Extraktion mit den Rohextrakten vorgenommen. Bei der Berechnung der Werte ist der Verdünnungsfaktor berücksichtigt worden, um möglichst die Enzymaktivitäten wiederzugeben, die während des Holzabbaus in den Kolben auftreten. Wie bereits erwähnt, dürften die wahren Enzymaktivitäten noch etwas größer sein, da die Extraktion nicht vollständig war. Zur Ermittlung der Null-Werte wurden die gleichen Ansätze benutzt, jedoch die Kulturfiltrate vor der Verwendung zur Inaktivierung der Enzyme eine halbe Stunde am Rückflußkühler gekocht.

Peroxydase

Bestimmung mit Hilfe des Bas-Testes (Lyr 1957) im Stickstoffstrom bei 25 °C (1 ml 0,02%iger Benzidinlösung in n/10 Acetatpuffer pH 5,3 + 1 ml Ascorbinsäure + 1 ml 0,3%iger H_2O_2-Lösung + 1 ml Enzymlösung). Die Peroxydase-Aktivität wird in mg oxydierter Ascorbinsäure je Sekunde ausgedrückt und auf 1 ml Kulturfiltrat bezogen.

Laccase

Die Bestimmung erfolgte ähnlich wie im Bas-Test, aber mit abgewandelten Reaktionsbedingungen (1 ml 0,003%iger Benzidinlösung in n/10 Acetatpuffer von pH 4,7 + 1 ml Ascorbinsäure + 1 ml Enzymlösung) bei 25 °C unter Durchströmung mit reinem Sauerstoff. Angabe der Aktivität ebenfalls in mg oxydierter Ascorbinsäure je Sekunde bezogen auf 1 ml Kulturfiltrat. Vergleichende Bestimmungen im Warburg-Apparat mit Guajakol als Substrat führten zu gleichen Ergebnissen, benötigten aber einen größeren Zeitaufwand, weshalb diese Methode nicht weiter verwandt wurde.

Cellulase

Die Aktivitätsmessung erfolgte viskosimetrisch mittels eines Höppler-Rheoviskosimeters. Als Substrat diente Modocoll lösliche Zellulose (Äthylhydroxyäthylzellulose) von Mo och Domsjö AG, Schweden (s. Jullander 1952[1])). 0,9 g Zellulose werden in 100 ml dest. Wasser gelöst, auf 40 bis 50 °C erwärmt und Verklumpungen und andere grobe Inhomogenitäten durch Zentrifugieren entfernt. 18 ml der Zellulose-Lösung (pH 4,9) werden mit 2 ml Enzym-Lösung sorgfältig gemischt und die Viskositätsabnahme nach 10 min bei 25 °C gemessen. Die Ausgangsviskosität wird mit Wasser an Stelle der Enzymlösung bestimmt und soll etwa 22 bis 30 cp betragen. Die Viskositätserniedrigung wird in % der Ausgangsviskosität angegeben. Als 100 Cellulase-Einheiten wird diejenige Enzym-Aktivität bezeichnet, die unter den gegebenen Bedingungen die Ausgangsviskosität um 50 % herabsetzt (vgl. die Eichkurve Abb. 1). Bei stärkeren Aktivitäten wurden die Kulturfiltrate entsprechend verdünnt. Die Methode erwies sich als zuverlässig und gut reproduzierbar.

[1]) Herrn Dr. Jullander möchten wir für die Überlassung von Informationsmaterial sowie einiger Modocoll-Präparate vielmals danken.

Pektinase

Bestimmung viskosimetrisch mit Hilfe des Höppler-Rheoviskosimeters. 3 % Pektin (Schuchardt) + 0,8 % NaCl in n/5 Acetatpuffer pH 5,0 gelöst, heiß durch Glaswolle filtriert. 10 ml Pektinlösung + 10 ml Enzymlösung gemischt, Viskositätsabnahme nach 30 min bestimmt (Inkubations- und Reaktionstemperatur 30 °C). Ausgangsviskosität (Gefäß 0,01 und 20 g Belastung) 26 bis 34 cp. 100 Pektinase-Einheiten = diejenige Enzymaktivität, die die Ausgangsviskosität nach 30 min um 50 % herabsetzt (vgl. Abb. 1) (entspricht etwa der Aktivität einer 0,025%igen Lösung eines käuflichen BAYER-Pektinase-Präparates).

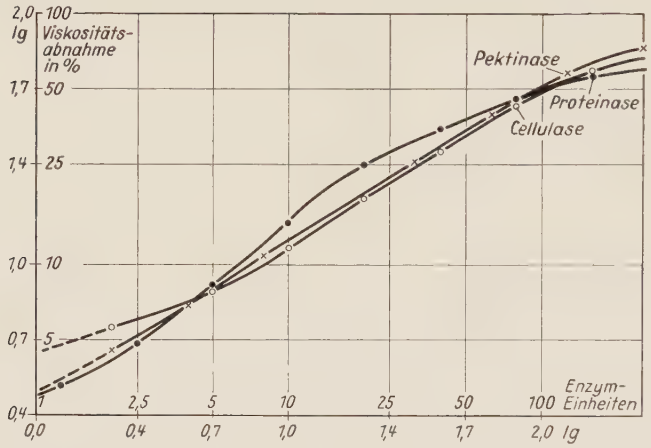


Abb. 1. Abhängigkeit der Viskositätsabnahme von der Enzymaktivität (Standardkurven für die viskosimetrische Bestimmung von Pektinase, Cellulase und Proteinase)

Proteinase

Viskosimetrische Bestimmung mittels des Höppler-Rheoviskosimeters. Reaktionsbedingungen in Anlehnung an KOCH und FERRARI (1955). 6 % Gelatine in n/5 Acetatpuffer pH 5,6 gelöst. 18 ml Gelatinelösung + 2 ml Enzymlösung gemischt und Viskositätsabnahme nach 90 min bestimmt (Inkubations- und Reaktionstemperatur 40 °C). Ausgangsviskosität (Gefäß 0,01 und 10 g Belastung 6 bis 8 cp. 100 Proteinase-Einheiten = diejenige Enzymaktivität, die die Ausgangsviskosität nach 90 min um 50 % herabsetzt (vgl. Eichkurve Abb. 1). Das entspricht etwa einer 0,038%igen Lösung von Trypsin der Firma Riedel.

α-Hydroxysäure-Oxydase

Reaktionsansatz: 1 ml 0,1 m l-Milchsäure + 0,5 ml n/5 Acetatpuffer pH 5,6 + 1 ml Enzymlösung + 0,5 ml Leberkatalase (im Seitenarm des Warburg-Gefäßes). Es wird die Sauerstoffaufnahme manometrisch im Warburg-Apparat bei 25 °C bestimmt und gebildetes Hydroperoxyd mittels Katalase nachgewiesen. Die Aktivität wird in μl aufgenommenen Sauerstoffs je Stunde ausgedrückt.

Glukose-Oxydase und andere Zuckeroxydasen

Manometrische Bestimmung der O_2-Aufnahme im Warburg-Apparat bei 25 °C mit Luft ohne KOH. Reaktionsansatz: 1 ml 0,1-m-Zuckerlösung + 0,5 ml n/5 Acetatpuffer pH 5,6 + 1 ml Enzymlösung + 0,5 ml verdünnte Leberkatalase (im Seitenarm des Gefäßes).

Die Aktivität wird als O_2-Aufnahme (in μl) je Stunde ausgedrückt (vgl. BENTLEY 1955). Die Aufnahme soll nicht mehr als 400 bis 500 μl/Std. betragen.

An Stelle von Glukose wurden noch folgende Zucker verwandt: Cellobiose, Mannose, Xylose, Arabinose, Galaktose.

Oxalsäure-Oxydase (Oxalsäure-Aerotranshydrogenase)

Manometrische Bestimmung der O_2-Aufnahme aus Luft im Warburg-Apparat bei 25 °C mit KOH. Ansatz: 1 ml 0,1-m-Oxalsäure + 0,5 ml n/5 Acetatpuffer pH 3,5 + 1 ml

Enzymlösung + 0,5 ml verdünnte Katalase (im Seitenarm des Warburg-Gefäßes) + 0,2 ml KOH. Die Aktivität wird als O_2-Aufnahme (in μl) je Stunde angegeben und Hydroperoxydbildung durch Zusatz von Katalase nachgewiesen.

Phosphoesterase

Gemessen wird die Hydrolyse von Phenylphosphat, indem das freigesetzte Phosphat bestimmt wird. Ansatz: 10 ml 0,1%iges Phenylphosphat (gelöst in n/5 Acetatpuffer pH 5,6) werden mit 10 ml Enzymlösung bei 30 °C inkubiert. Nach 60 min wird die Reaktion mit 5%iger Trichloressigsäure unterbrochen (2 ml Reaktionsmischung + 1 ml Trichloressigsäure), der Eiweißniederschlag abzentrifugiert und das freigesetzte Phosphat mit Ammonium-molybdat + Zinn-II-chlorid nach KUTTNER und LICHTENSTEIN bestimmt (s. PAECH und TRACEY 1956).

Orthophosphat-Transglukosidasen (Disaccharid-Phosphorylasen)

Aktivitätsmessung nach DOUDOROFF (1955). Ansatz: 0,2 m Rohrzucker (gelöst in 0,066 m Phosphatpuffer nach SØRENSEN pH 6,64) und die Enzymlösung werden zu gleichen Teilen gemischt und bei 30 °C inkubiert. Nach 20 min wird die Reaktion unterbrochen durch Mischung von 2 ml Reaktionsmischung mit 1 ml 5%iger Trichloressigsäure und nach entsprechender Verdünnung die Abnahme an anorganischem Phosphat bestimmt. 1 Einheit = diejenige Enzymmenge, die in 20 min unter obigen Bedingungen eine Phosphataufnahme von 1 μmol bewirkt.

An Stelle von Saccharose wurde auch Cellobiose verwendet.

Amylase

Gleiche Volumina der Enzymlösung und einer 0,65%igen Stärkelösung (Amylum solubile; 0,01 m NaCl; 0,03 m Acetatpuffer pH 5,0) werden gemischt und bei 30 °C im Brutschrank aufbewahrt. Nach 4 Std. Fixierung durch Enteiweißung mit Zinksulfat-Natronlauge und Bestimmung der reduzierenden Zucker nach HAGEDORN-JENSEN (vgl. BERNFELD 1955).

Cellobiase

Gleiche Volumina der Enzymlösung und einer 2%igen Lösung von Zellobiose (in 0,2 n Acetatpuffer pH 6,2) werden gemischt und bei 30 °C inkubiert. Nach 8 Std. Bestimmung des Anstieges des Reduktionswertes wie bei Amylase beschrieben (vgl. SUMNER and HOWELL 1936).

Saccharase (β-h-Fruktosidase)

Gleiche Volumina der Enzymlösung und einer 2,5%igen Lösung von Saccharose (in 0,2 n Acetatpuffer pH 4,7) werden gemischt und bei 30 °C inkubiert. Bestimmung des Anstieges der reduzierenden Kraft nach 8 Std. wie bei Amylase angegeben (s. BERNFELD 1955).

Pektase (Pektin-methylesterase)

Eine Mischung gleicher Teile der Enzymlösung und einer 1%igen Pektinlösung mit 0,1 m NaCl wird bei eintauchender Meßkette auf einen Ausgangs-pH-Wert von 5,0 mit 0,1 n NaOH eingestellt. Inkubation bei 30 °C. Mit 0,02 n NaOH wird der pH-Wert laufend wieder auf den Ausgangswert gebracht, ehe der pH-Wert unter 4,5 sinkt (s. BOCK 1941). Der Verbrauch an 0,02 n NaOH nach 24 Std. gilt als Maß der Pektase-Aktivität.

Tannase

Eine Mischung gleicher Teile der Enzymlösung und einer 0,545%igen Lösung von Gallussäuremethylester wird bei eintauchender Meßkette und kontinuierlicher Rührung mit 0,1 n NaOH auf pH 5,0 eingestellt und die hydrolytische Spaltung durch fortlaufende Titration mit 0,02 n NaOH verfolgt. Reaktionstemperatur 30 °C. Aus dem Verbrauch an NaOH nach 24 Std. „Tannase-Einheiten" nach FREUDENBERG berechnet (vgl. SCHMIDT 1941).

pH-Wert

Die pH-Messung erfolgte mit einer hochohmigen Glaselektrode und einem Röhrenvoltmeter.

N-Bestimmung

Nach dem Kjeldahl-Verfahren (Einzelheiten bei ZIEGLER 1957).

Reduktionswerte

Bestimmung des Reduktionswertes nach der Methode von HAGEDORN-JENSEN nach vorheriger Enteiweißung der Kulturfiltrate mit Zinksulfat + Natronlauge.

Extinktion

Messung im Pulfrich-Photometer mit Filter S 47 und Kuvette 2 cm.

Holzanalyse

Heißwasserlösliches: 2 g Untersuchungsmaterial werden mit 100 ml dest. Wasser 3 Std. am Rückflußkühler gekocht, filtriert, mit 500 ml heißem Wasser nachgewaschen und der Gewichtsverlust bestimmt (SCHWALBE und SIEBER 1931). Von diesem Material werden Zellulose und Alkalilösliches bestimmt.

Benzol-Alkohol-Lösliches: 5 g lufttrockene Substanz werden mit Benzol-Alkohol (Gemisch 1 : 1) 6 Std. im Soxleth-Apparat extrahiert und die extrahierten Substanzen nach Abdampfen des Lösungsmittels gewichtsmäßig bestimmt (SCHWALBE u. SIEBER S. 81). Die extrahierte Substanz wird für die Ligninbestimmung benutzt.

Pentosanbestimmung: nach modifizierter Tollens-Methode (Merkblatt IX der Faserstoffanalysenkommission des Vereins der Zellstoff- und Papierchemiker und Ingenieure sowie SIEBEL S. 489).

Alkalilösliches: 2 g Substanz werden 1 Std. mit 100 ml 1%iger Natronlauge auf dem Wasserbade erhitzt. Das unlösliche Material wird mit heißem Wasser gewaschen, mit 10%iger Essigsäure neutralisiert und nach Trocknung der Gewichtsverlust bestimmt (s. SCHWALBE und SIEBER S. 94).

Zellulosebestimmung: nach KÜRSCHNER. 1 g Substanz wird unter Rückfluß mit einer Mischung von Alkohol-Salpetersäure (4 : 1) dreimal mit je 25 ml 1 Std. gekocht. Danach wird die verbliebene Zellulose gut gewaschen, getrocknet und gewogen (s. SCHWALBE und SIEBER S. 115).

Ligninbestimmung: nach HALSE (s. SANDERMANN S. 178). 1 g Substanz wird 1 Std. mit konz. HCl hydrolysiert und später mit einem Zusatz von konz. H_2SO_4 12 Std. stehengelassen. Nanach wird 5 min mit 750 ml Wasser gekocht, filtriert, sorgfältig nachgewaschen und das unlösliche Lignin nach Trocknung gewogen.

Jede Einzelbestimmung wurde zwei- bis dreimal wiederholt und aus den Analysenergebnissen ein Mittelwert gebildet.

II. Pilzwachstum

Das Wachstum der beiden Pilze auf den Buchenholzspänen war unterschiedlich. *Collybia velutipes* zeigte anfangs eine sehr rasche und üppige Entwicklung und hatte bald die Holzoberfläche überzogen. Nach einigen Wochen begann aber das Wachstum sichtlich nachzulassen, weshalb durch den Zusatz einer komplexen Vitaminlösung (II) und durch einen Zusatz von Bakteriozym (III) versucht wurde, das Wachstum anzuregen. Das gelang in gewissem Grade, wenn auch das üppige Jugendwachstum nicht erreicht wurde. Den Ursachen hierfür wurde nicht weiter nachgegangen. Dieser Pilz bevor-

zugt unter natürlichen Bedingungen das nährstoffreiche Splintholz von Laubhölzern und ist ernährungsphysiologisch offenbar anspruchsvoller als andere Holzzerstörer. Wie spätere Versuche zeigten, hat er einen hohen Phosphatbedarf. Möglicherweise wirkte der relativ geringe Phosphatzusatz begrenzend für das Wachstum.

Phellinus igniarius wuchs anfänglich langsam, dafür aber anhaltend kräftig und bedurfte keiner weiteren Zusätze. Nach wenigen Wochen war das Holz so von Pilzhyphen durchflochten, daß eine Trennung von Myzel und Holzsubstanz nicht mehr möglich war. Da sich das Pilzwachstum nicht durch Bestimmung der Gewichtszunahme an Myzeltrockensubstanz feststellen ließ, wurde versucht, auf indirektem Wege den Zuwachs zu bestimmen. Zu diesem Zwecke ermittelten wir den Stickstoffgehalt der Kulturflüssigkeit und der Trockensubstanz (TS), die sich aus unzersetztem Holz und Pilzhyphen zusammensetzt.

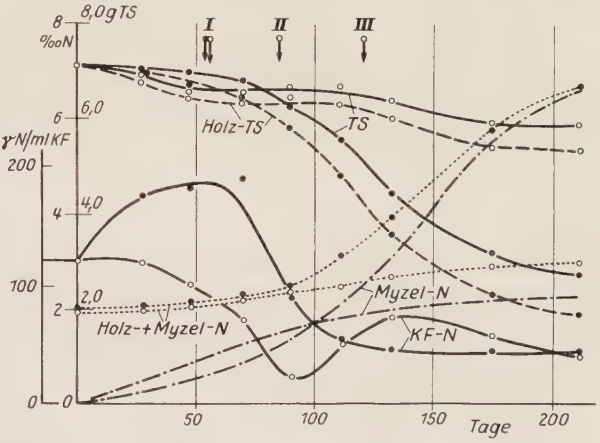


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Abnahme der Gesamttrockensubstanz (TS) und der Holztrockensubstanz. (Holz-TS = TS korrigiert um das Myzeltrockengewicht, unterbrochene Linie)
Veränderung des Stickstoffgehaltes von Kulturfiltrat (KF-N) und TS (Holz- und Myzel-N). Unterbrochene Linie = Myzel-N (konstruiert).
·———· *Ph. igniarius*, o———o *C. velutipes*
I—III = nachträgliche Zusätze während des Versuches
(I = 10 ml Aqua dest./Kolben,
II = 3 ml Vitaminkomplexlösung/Kolben,
III = 3 ml Bakteriozymlösung/Kolben)

Wie aus Abbildung 2 zu ersehen ist, nimmt der N-Gehalt der TS im Laufe der Zeit ständig zu, was nur durch die N-Assimilation der Pilzhyphen zu erklären ist. Das unbeimpfte Buchenholz enthält bereits eine beträchtliche N-Menge, die durch den N-Gehalt des Holzes selbst und durch Adsorption von N-haltigen Stoffen der Nährlösung bedingt ist. Das wachsende Pilzmyzel kann daher seinen N-Bedarf aus der Nährlösung und aus dem Holz decken. Der N-Gehalt des Kulturfiltrates nimmt bei *Collybia velutipes* langsam ab und erreicht bei 90 Tagen ein Minimum (Abb. 2) (bedingt durch anfänglich rasches Wachstum bei geringerer Enzymausscheidung), während bei *Ph. igniarius* zunächst ein Anstieg im N-Gehalt des Kulturfiltrates zu beobachten ist (bedingt durch langsames Anfangswachstum und starke Enzymausscheidung). Der erneute Anstieg des N-Spiegels im KF bei *C. velutipes* wird wahrscheinlich durch die Zusätze und die dadurch gesteigerte Enzymproduktion verursacht.

Aus den Stickstoffwerten wurde für jeden Pilz eine Zuwachskurve des N-Gehaltes der Myzelien konstruiert, die dadurch etwas unsicher sein muß,

daß sich nicht exakt ermitteln läßt, in welchem Ausmaß der Holz-Stickstoff in Myzel-Stickstoff überführt wurde. Überschlägige Berechnungen ergaben, daß die Pilze bei Versuchsabschluß noch nicht allen verfügbaren Stickstoff aufgenommen haben. Immerhin dürften die konstruierten Kurven wenigstens den ungefähren Zuwachs der Pilze wiedergeben. Die N-Werte lassen sich auf Myzel-Trockensubstanz umrechnen, die zur Ermittlung des wahren Verlustes an Holz-Trockensubstanz benutzt werden kann (gestrichelte Linie in Abb. 2). Die Differenz von gefundenem TS-Verlust und dem Holz-TS-Verlust ist die Myzel-TS. Der Stickstoffgehalt des Myzels beträgt bei *Ph. igniarius* durchschnittlich 2,71 % und bei *C. velutipes* 1,57 % der Myzel-TS.

Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, daß *C. velutipes* zunächst eine stärkere Abnahme an Holz-Trockensubstanz verursacht, die aber nach 50 Tagen fast zum Stillstand kommt, um erst später unter der Einwirkung der Zusätze II und III wieder zuzunehmen. Die Tatsache findet ihre Erklärung in dem geschilderten Wachstumverhalten.

Die maximale TS-Abnahme beträgt 23 % (korrigiert) und die errechnete maximale Produktion an Myzel-TS 740 mg/Kolben. *Ph. igniarius* hingegen bewirkt anfänglich eine langsame, später aber stark zunehmende TS-Verminderung, die bei Versuchsabschluß 74 % (korrigiert um das Myzeleigengewicht) ausmacht. Die maximale Myzel-TS erreichte nach der konstruierten N-Kurve 920 mg/Kolben. Daraus ist deutlich das kräftigere Wachstum dieses Pilzes zu erkennen.

C. velutipes ruft nur eine geringfügige Abnahme des pH-Wertes (von 7,5 auf 6,5) hervor (Abb. 3). Dieses Verhalten ist für diesen Pilz charakteristisch, der zu den wenigen Arten gehört, die auch auf Malz-Agar keine nennenswerte Ansäuerung des Substrates verursachen. *Ph. igniarius* dagegen senkt den pH-Wert bis auf 4,1 trotz des Zusatzes an $CaCO_3$. Immerhin ist durch diesen erreicht, daß der pH-Wert in einem physiologischen Bereich blieb, in dem eine Wachstumshemmung des Pilzes noch nicht zu erwarten ist, da dieser unter anderen Kulturbedingungen noch tiefere pH-Werte erträgt.

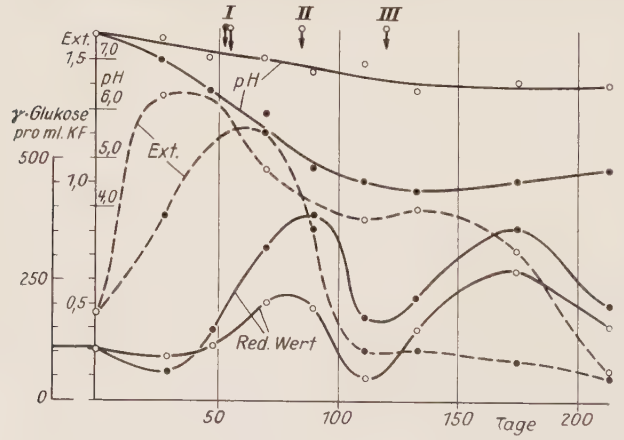


Abb. 3. Änderungen des pH-Wertes, der Extinktion und des Reduktionswertes (ausgedrückt als Glukose) des Kulturfiltrates. Sonstige Bezeichnungen wie in Abbildung 2

Beide Arten rufen anfänglich eine Dunkelfärbung des Kulturfiltrats hervor (vgl. Extinktionswerte in Abb. 3), die bei *Ph. igniarius* nach etwa 100 Tagen fast verschwunden ist, während sie bei dem anderen Pilz noch länger erhalten bleibt. Offenbar handelt es

sich hierbei um die Freisetzung und enzymatische Oxydation von Gerbstoffen, Polyphenolen sowie von Ligninbestandteilen während der Holzzersetzung. Die dunkelgefärbten Oxydationsprodukte reichern sich im KF nur im Anfangsstadium des Pilzangriffes stärker an, solange die Myzelentwicklung und der Abbau noch gering sind. Es fällt eine Parallele zwischen dem Auftreten dunkel gefärbter Produkte und der anfänglichen Zunahme des Alkalilöslichen (Abb. 9) auf, die auf einen kausalen Zusammenhang hinweist. Der Abbau verläuft bei *Ph. igniarius* offensichtlich rascher und vollständiger, was mit der aktiven Tannase und Peroxydase (s. Abb. 4 u. 5) in Verbindung gebracht werden kann.

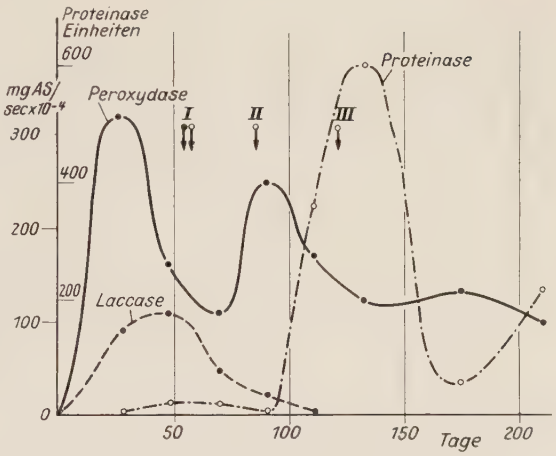


Abb. 4. Zeitlicher Verlauf der Peroxydase- und Laccase-Aktivität von *Ph. igniarius* (·———·) sowie der Proteinase-Aktivität von *C. velutipes* (o———o) (Laccase: mg AS/sec × 10⁻⁵)

Die Reduktionswerte des Kulturfiltrates nehmen zunächst etwas ab (Aufnahme löslicher Substanzen durch das heranwachsende Myzel), um nach etwa 50 Tagen kräftig anzusteigen. Dieser Anstieg erfolgt nach dem Auftreten eines Aktivitätsmaximums der Cellulasen und Amylasen, so daß die Annahme berechtigt ist, daß es sich hierbei um das Auftreten von reduzierenden Zuckern handelt. Daß diese mit einem gegenüber den Enzymaktivitäten zeitlich verschobenen Maximum in der KF nachweisbar sind, wird verständlich, wenn man bedenkt, daß die Reduktionswerte beim Abbau von Stärke und Zellulose erst mit längerer Enzymeinwirkung stärker zunehmen. Außerdem kann im KF nur ein vom Myzel nicht verwertbarer Überschuß an Zuckern in Erscheinung treten. Der Rückgang dürfte auf dem zunehmenden Verbrauch durch das wachsende Myzel beruhen. Problematisch ist dagegen der erneute Anstieg des Reduktionswertes,

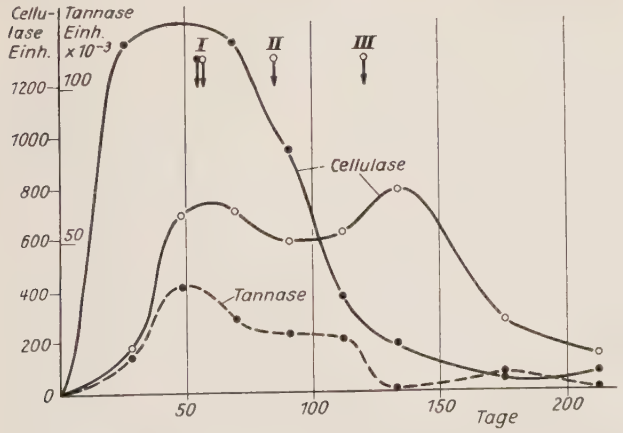


Abb. 5. Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung von Cellulase und Tannase.
·———· *Ph. igniarius*, o———o *C. velutipes*

der kaum durch die Zunahme an reduzierenden Zuckern bedingt sein kann, da — mit Ausnahme der Cellulase von *C. velutipes* — kein gleichartiger Anstieg der Enzymaktivitäten zu beobachten ist. Möglicherweise handelt es sich hier um die Ausscheidung reduzierender Substanzen unbekannter Struktur, wie sie bereits in Malzkulturen festgestellt worden sind (LYR 1956), so daß das zweifache Maximum durch die Überschneidung zweier verschiedener Kurven zu erklären wäre.

III. Enzymausscheidung

Wie im methodischen Teil bereits angedeutet, ist die Extraktion der Enzyme möglichst schonend vorgenommen worden. Der sehr geringe Katalase-Gehalt der Kulturfiltrate spricht dafür, daß die nachgewiesenen Enzyme tatsächlich echte Ektoenzyme darstellen. Aus den Abbildungen 4 bis 7 ist zu entnehmen, daß der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität für die einzelnen Enzyme unterschiedlich ist, was als Beweis für den geringen Einfluß methodischer Fehler z. B. durch die zufällig bevorzugte Auswertung stark- oder schwachwüchsiger Kulturen angesehen werden kann. Auf die Schwierigkeiten der quantitativen Extraktion der Enzyme wurde bereits hingewiesen. Entsprechend dem schwächeren Wachstum besitzt *C. velutipes* eine geringere Enzymproduktion, die qualitativ von der von *Ph. igniarius* abweicht.

Bei beiden Arten fällt auf, daß bei fast allen Enzymen die maximale Aktivität in den ersten beiden Monaten des Versuches nachzuweisen ist, obwohl in dieser Zeit die Myzelbildung noch relativ gering ist. Eine Parallelität läßt sich nicht erkennen. Das zeigt sich auch darin, daß *C. velutipes* trotz anfänglich schnelleren Myzelwachstums langsamer mit der Enzymausscheidung einsetzt, während *Ph. igniarius* bereits bei geringem Myzelgewicht eine starke Enzymausscheidung zeigt. Ähnliche Erfahrungen machten auch FAHRAEUS, TULLANDER und LJUNGGREN (1958) bei der Untersuchung der Laccase-Bildung durch einige Holzzerstörer. *C. velutipes* nährt sich offenbar anfänglich von den leicht zugänglichen Holzbestandteilen, was auch seinem natürlichen Vorkommen im nährstoffreichen Splintholz von Laubgehölzen entspricht. Wenn auch die Möglichkeit besteht, daß anfangs die Extraktion der Enzyme vollständiger ist wegen der geringen Verfilzung des Substrates durch die Hyphen, so ist es doch sicher, daß die erhaltenen Aktivitätskurven eine zeitlich verschiedene Enzymproduktion widerspiegeln. Diese Ansicht wird durch das Auftreten eines zweiten Aktivitätsmaximums unterstützt. Selbstverständlich lassen sich mit der gewählten Methodik nur Aussagen über die Aktivität, nicht aber über die Quantität der Enzyme machen. Erstere kann durch Reaktionsprodukte beeinflußt werden, so daß die dargestellten Kurven nicht mit der Enzymproduktion unbedingt übereinzustimmen brauchen. Für eine ökologische Betrachtungsweise sind nur die Enzymaktivitäten von Bedeutung, die allerdings wiederum in gewissem Grade von den Untersuchungsbedingungen abhängen.

P e r o x y d a s e : Dieses Enzym wird nur von *Ph. igniarius* gebildet (LYR 1956, 1958 a). Das Aktivitätsmaximum war bereits nach 30 Tagen erreicht. Die Aktivität erreichte allerdings zu keinem Zeitpunkt den Maximal-

wert von 150 mg AS/sec · 10^{-3}, der unter Verwendung des gleichen Pilzes bei einer Kultur auf Malzlösung gemessen wurde (Lyr 1956). Die damals zu beobachtende Parallelität der Zunahme von Enzymaktivität und Myzelgewicht ist bei den vorliegenden Versuchen nicht festzustellen. Das ist verständlich durch das sehr unterschiedliche Nährstoffangebot. Immerhin ist es interessant, daß die PO nicht nur bei einem Überschuß an leicht aufnehmbaren Nährstoffen, sondern auch unter erschwerten Bedingungen der Nährstoffaneignung gebildet wird. Ihre anhaltend hohe Aktivität spricht für eine Beteiligung am Aufschluß der Holzsubstanz. Da in der Malzlösung kaum oxydierbare Substanzen vorhanden sind, ist eine stärkere Anreicherung der PO verständlich, während auf dem Holz oxydative Umsetzungen möglich sind, die zu einem Verbrauch an Enzym führen können.

Laccase: Während bei Malzkulturen des verwendeten Stammes von *Ph. igniarius* mit Hilfe von Benzidin eine Laccase-Aktivität nur selten nachgewiesen werden kann (Lyr 1958), war während des Holzabbaues in den ersten 100 Tagen eine deutliche Laccase-Aktivität in dem Filtrat feststellbar. Damit ist das Auftreten dieses Enzymes während des Holzabbaues gesichert. Problematisch ist nur die Entscheidung, ob nach 110 Tagen die Enzymausscheidung aufhört, oder ob reduzierende Substanzen einen Nachweis verhindern. Die Lösung dieser Frage ist wichtig für die Beurteilung der Bedeutung dieses Enzyms für den Ligninabbau. Dieser geht auch nach dem Verschwinden der Laccase-Aktivität kräftig weiter (Abb. 8). Das Auftreten reduzierender Substanzen unbekannter Art konnte bereits bei Malzkulturen verschiedener Pilze beobachtet werden (Lyr 1956), so daß mit einer Maskierung der Laccase-Aktivität gerechnet werden muß. Es ist aber eine offene Frage, ob eine vorhandene, durch reduzierende Substanzen aber gehemmte Laccase von physiologischer Bedeutung ist. Die physiologische Aktivität hängt im wesentlichen von den Red-Ox-Potentialen des zu oxydierenden natürlichen Substrates und der reduzierenden Substanzen ab. Da beide unbekannt sind, lassen sich noch keine endgültigen Schlüsse ziehen. Darüber hinaus darf eine mögliche Reaktionsinaktivierung nicht außeracht gelassen werden, die ein Nichtvorhandensein des Enzymes vortäuschen kann.

Bei *C. velutipes* war unter den gewählten Versuchsbedingungen weder mit Benzidin noch mit Guajakol eine Laccase-Ausscheidung nachweisbar. Selbst bei Annahme von Maskierung durch reduzierende Substanzen kann die Laccase-Aktivität nur außerordentlich gering sein. Wie andere Versuche ergaben, ist bei dieser Art eine Laccase-Bildung durch induzierende Eingriffe auf einem Malznährboden leicht zu erreichen (Lyr 1958 b). Noch unveröffentlichte Ergebnisse zeigen aber, daß unter den Bedingungen des Holzabbaues eine Induktion schwieriger, d. h. die Neigung des Pilzes zur Laccase-Bildung geringer ist. Dennoch ist es möglich, daß das Enzym mit geringer Aktivität sich am Holzabbau beteiligte. Dafür sprechen die Extinktionswerte, die eine Oxydation von Polyphenolen erkennen lassen. Die Reaktionsinaktivierung während der Umsetzung des Substrates kann eine sehr schwache Aktivität völlig zum Verschwinden bringen, so daß trotz einer schwachen Enzymproduktion keine Aktivität im Kulturfiltrat nachweisbar ist.

Proteinasen (Abb. 4): Unter diesem Sammelbegriff werden diejenigen Ektoenzyme zusammengefaßt, die eine Viskositätsverminderung von Gelatinelösung bewirken. Ihr Vorkommen ist bei Holzzerstörern nach eigenen Untersuchungen sehr verbreitet. Über das Wirkungsspektrum und ihre Einheitlichkeit und damit über die Klassifikation lassen sich vorläufig keine genaueren Angaben machen. Eine merkliche Aktivität konnte in den vorliegenden Untersuchungen nur bei *C. velutipes* festgestellt werden. Die anfänglich sehr geringe Aktivität stieg nach dem Vitaminzusatz plötzlich außerordentlich stark an, um nach etwa 30 Tagen wieder abzusinken. Es ist naheliegend, eine direkte Induktionswirkung durch den Vitaminzusatz zu vermuten. Da ein Kontrollversuch aber fehlt, läßt sich diese Ansicht nicht beweisen.

Es ist auffällig, daß gerade *C. velutipes* zur Ausscheidung von Proteinasen neigt. Offensichtlich handelt es sich hier nicht um autolytische Prozesse, da der Holzabbau und die Produktion anderer Enzyme ungestört weiter gehen. Der Unterschied gegenüber *Ph. igniarius* wird vielleicht bei Berücksichtigung der Ökologie der beiden Arten verständlich. *Ph. igniarius* ist vorwiegend ein Kernholzzerstörer, während *C. velutipes* das eiweißreichere Splintholz verschiedener Laubholzarten bevorzugt. Auch *Trametes versicolor*, ebenfalls ein Splintholzzerstörer, scheidet während des Holzabbaues Proteinasen aus (LYR und ZIEGLER 1959). *Ph. igniarius* ist hierzu nur in der Lage, wenn er auf einem Gelatinemedium kultiviert wird. Bei den Splintholzbewohnern ist die Proteinase-Ausscheidung offenbar stärker konstitutiv ausgeprägt, während sie bei dem Kernholzzerstörer *Ph. igniarius* adaptiv erfolgt.

Cellulase: Wenn auch die Verwendung von löslicher Zellulose als Testsubstrat keine unmittelbaren Rückschlüsse auf das Ausmaß der Spaltung nativer Zellulose erlaubt, so ist dieses Verfahren sicher geeignet, die unterschiedlichen Enzymaktivitäten zu erfassen. (Vgl. die Diskussion dieser Frage bei SCHAEFFER 1957). Es ist wahrscheinlich, daß auch die „Cellulase" der höheren Pilze nicht einheitlich ist, sondern ein Enzymgemisch darstellt (vgl. STONE 1957). Für die vorliegende Fragestellung erscheint es jedoch berechtigt, vereinfachend von „der Cellulase" zu sprechen. Die beiden Pilze unterscheiden sich deutlich in der Quantität als auch in dem zeitlichen Verlauf der Enzymausscheidung. Obwohl *Ph. igniarius* anfänglich weniger Myzel als *C. velutipes* ausbildet, steigt die Cellulase-Aktivität schon wenige Tage nach der Beimpfung stark an, während *C. velutipes* trotz reichlicher Myzelbildung zögernder mit der Enzymausscheidung einsetzt. Diese Unterschiede sind charakteristisch für die beiden Arten und wahrscheinlich ein Ausdruck ihrer unterschiedlichen Ökologie. Bemerkenswert ist die rasch und intensiv einsetzende Cellulase-Produktion von *Ph. igniarius*, wenn man bedenkt, daß es sich um einen typischen Weißfäuleerreger handelt. Das Ausmaß der Cellulase-Ausscheidung ist ebenfalls als artspezifisch anzusehen. Wie eingehendere Versuche mit Flüssigkeitskulturen unter Verwendung von reiner Zellulose als C-Quelle ergaben, gehört *Ph. igniarius* zu den Arten mit reichlicher Cellulase-Produktion, wenngleich er hierin von den typischen Braunfäuleerregern noch über-

troffen wird (Lyr 1959). *C. velutipes* ist nur zu einer mittleren Cellulase-Bildung befähigt. Die in Flüssigkeitskulturen erhaltenen maximalen Aktivitäten entsprechen etwa den vorliegenden Maximalwerten. Die zweigipflige Aktivitätskurve von *C. velutipes* ist wahrscheinlich durch die Wachstumsstimulation nach Zugabe der vitaminhaltigen Zusätze zu erklären. Die möglichen Beziehungen zwischen Reduktionswert des Filtrates und Enzymaktivität wurden bereits diskutiert.

Cellobiase: Merkwürdigerweise konnte bei beiden Arten keinerlei Cellobiase-Aktivität im Filtrat nachgewiesen werden, obwohl das extrazelluläre Vorkommen dieses Enzyms bei *C. velutipes* von Norkrans (1957) eindeutig festgestellt wurde. Da die Cellulase-Aktivitäten etwa denen von Flüssigkeitskulturen mit reiner Zellulose entsprachen, war das Ergebnis überraschend. Möglicherweise ist das angewandte Nachweisverfahren nicht empfindlich genug, um kleinere Aktivitäten festzustellen. Andererseits können Zellobiose und andere niedrigmolekulare Oligosaccharide auch ohne vorherige Spaltung von der Pilzhyphe aufgenommen und intrazellulär nach einer Phosphorylierung verwertet werden. Papierchromatographische Zuckerbestimmungen zur Klärung der Frage, ob Glukose als Spaltprodukt im Filtrat erscheint, konnten aus Zeitmangel nicht durchgeführt werden. Daher muß das Problem der Beteiligung einer extrazellulären Cellobiase am Holzabbau als noch ungeklärt angesehen werden. Es ist zu vermuten, daß das Enzym vorwiegend intrazellular auftritt.

Pektinase (P) und Pektase (PE): Über das Vorkommen dieser Enzyme bei niederen Pilzen liegen bereits zahlreiche Arbeiten vor, jedoch ist bisher wenig über ihre Mitwirkung beim Holzabbau bekannt. Das Holz ist in vieler Hinsicht nicht mit dem unverholzten Gewebe krautiger Pflanzen vergleichbar, das mit Hilfe pektinspaltender Enzyme leicht angegriffen werden kann. Eine ausführlichere Diskussion dieser Frage soll zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, da spezielle Untersuchungen hierüber noch nicht abgeschlossen sind. Die Angaben über das Vorkommen dieser Enzyme bei höheren Pilzen sind sehr unvollständig und lassen keine Rückschlüsse auf das Auftreten während des Holzabbaues zu.

Für die Aktivitätsbestimmung der Pektinase mußte Pektin verwendet werden, da Pektinsäure nicht erhältlich war. Das könnte eine Fehlerquelle sein, falls die Pektinase auf den Grad der Methylierung anspricht, wie das bei einigen Enzym-

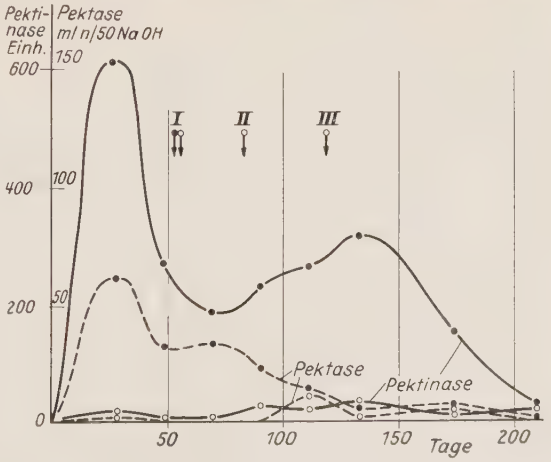


Abb. 6. Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung von Pektinase und Pektase.
·———· *Ph. igniarius* o———o *C. velutipes*

herkünften der Fall ist (siehe HOFMANN-OSTENHOF 1954 sowie GÄUMANN und BÖHNI 1947). Es wäre dann zu erwarten, daß die Pektinase-Aktivität der Pektase-Aktivität folgt. Wie aus Abbildung 6 zu ersehen ist, trifft das für *Ph. igniarius* nicht zu, da nach 140 Tagen ein zweites P-Maximum zu beobachten ist, obwohl die PE-Aktivität nur noch unerheblich ist. Außerdem dürfte sich die ziemlich schwache Pektase während der für die Pektinase-Bestimmung erforderlichen Zeit von 30 min kaum in nennenswerter Weise auswirken. Wenn in dieser Richtung auch keine speziellen Versuche angestellt wurden, so ist doch anzunehmen, daß die ausgeschiedenen Enzyme zu dem von ROBOZ, BARRATT und TATUM (1952) beschriebenen Typ der „Pektin-Depolymerase" (nach HOFMANN-OSTENHOF: „Polymethylgalacturonidase") gehören, die Pektin und Pektinsäure in gleicher Weise spalten. *C. velutipes* hat gegenüber *Ph. igniarius* eine auffallend geringe Aktivität, was artspezifisch sein dürfte, da ähnliche Resultate auch in anderen Versuchen (LYR 1959) erhalten wurden. Es zeigte sich, daß beide Arten auch in Abwesenheit von Pektin Pektinase ausscheiden, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität auf verschiedenen Substraten. Die Werte dieser Versuchsserie entsprechen etwa denen bei einem Wachstum auf reiner Glukose als C-Quelle, so daß keine wesentliche Stimulation durch Pektinstoffe des Holzes festzustellen ist. Ob die pektinspaltenden Enzyme überhaupt von größerer Bedeutung für den Holzabbau sind, ist noch ungewiß.

Xylanase: Die Ausscheidung von Hemicellulasen wurde in dieser Versuchsserie nicht quantitativ verfolgt. Aus späteren Versuchen ergibt sich jedoch, daß beide Pilzarten zusammen mit Cellulase eine recht aktive Xylanase ausscheiden, die offenbar noch leichter als Cellulase gebildet wird. Vermutlich werden auch noch andere Hemicellulasen ausgeschieden, worüber aber wenig bekannt ist.

Tannase: Die Bildung dieses Enzyms ist besonders bei niederen Pilzen (*Aspergillus, Penicillium, Mucor*) studiert worden (s. zusammenfassende Darstellung von SCHMIDT 1941). Tannase kommt meist mit größerer Aktivität intrazellulär vor und wird von *Aspergillus niger* erst bei der Sporenbildung zusammen mit anderen Enzymen ausgeschieden (NICHOLSON und Mitarbeiter 1931). Für ihre Synthese ist bei manchen Pilzen die Anwesenheit eines hydrolysierbaren Gerbstoffes erforderlich (SCHMIDT 1941). Das Vorkommen von Tannase bei höheren Pilzen wurde bisher nur gelegentlich und unter nicht vergleichbaren Bedingungen untersucht (s. Zusammenstellung bei GARREN 1938). Die einzelnen Autoren verwandten unterschiedliche Kulturbedingungen und machten keine Angaben über das Auftreten als Ektoenzym. Nur GARREN benutzte Holz als Substrat. Nach den vorliegenden Angaben tritt das Enzym sowohl bei Weiß- wie bei Braunfäule-Erregern auf, was nach seinem Vorkommen bei niederen Pilzen auch zu erwarten ist.

In unseren Versuchen konnte Tannase nur bei *Ph. igniarius* nachgewiesen werden, was im Widerspruch zu dem Befund von SCHMITZ (1921) steht, der im Myzel dieses Pilzes keine Tannase feststellen konnte. Da SCHMITZ den Pilz jedoch auf Karotten kultivierte, läßt sich das unterschiedliche Ergebnis

evtl. durch den Einfluß des Substrates erklären. Aus Abbildung 5 ist außerdem ersichtlich, daß das Enzym nur eine begrenzte Zeit mit nennenswerter Aktivität im Filtrat nachweisbar ist. *C. velutipes* bildete in diesem Versuch keine Tannase, obwohl der Pilz unter besonderen Bedingungen zur Tannase-Synthese befähigt ist (LYR und ZIEGLER 1959). Da Tannase nur bedingt als extrazelluläres Enzym anzusehen ist, kann ein negativer Nachweis im Kulturfiltrat noch nicht als ein Beweis für ein völliges Fehlen des Enzyms angesehen werden. Für die Spaltung der Ester der Phenylcarbonsäuren ist es wahrscheinlich nicht wesentlich, ob sie intra- oder extrazellulär erfolgt.

A m y l a s e : Dieses Enzym ist bei Mikroorganismen weit verbreitet und auch mehrfach bei höheren Pilzen nachgewiesen worden (s. GARREN 1938). Es gehört neben Invertase und β-Glukosidasen zu den am häufigsten gefundenen Enzymen. Das mag teilweise auf die leichte Nachweisbarkeit, teilweise auf die gewählten Kulturbedingungen zurückzuführen sein. Während SMIRNOVA (1957) die adaptive Bildung für *Aspergillus oryzae* feststellte, fanden MANDELS und REESE (1957) bei *Trichoderma viride* Amylase-Ausscheidung auf fast allen Substraten, die ein Wachstum zuließen. BOSE und SARKER (1937) wiesen bei 8 Arten von Holzzerstörern, die auf 2%iger Malzlösung kultiviert worden waren, Amylase sowohl in den Myzelien als auch — mit wesentlich größerer Aktivität — im Kulturfiltrat nach. Es gehört die Amylase demnach zu den „nicht ausgeprägt adaptiven Enzymen" im Sinne KARSTRÖMS (1938).

Wie Abbildung 7 zeigt, scheiden beide Pilze während des Holzabbaues eine recht aktive Amylase aus. Die größte Aktivität liegt wiederum in den ersten 100 Tagen des Versuches. Die Ausscheidung setzt bei *Ph. igniarius* ähnlich wie bei den anderen Enzymen rascher ein als bei *C. velutipes*. Versuche mit Flüssigkeitskulturen ergaben, daß Amylase von vielen Holzzerstörern mit ziemlich großer Aktivität auch bei Abwesenheit von Stärke ausgeschieden wird, was den oben erwähnten Befunden von MANDELS und REESE entspricht.

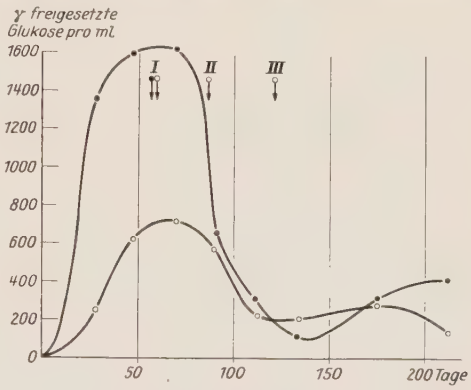


Abb. 7. Zeitlicher Verlauf der Ausscheidung von Amylase.
·———· *Ph. igniarius*, o———o *C. velutipes*

S a c c h a r a s e : Obwohl dieses Enzym bei zahlreichen Holzzerstörern sowohl im Myzel als auch extrazellulär gefunden wurde (GARREN, sowie BOSE und SARKER), konnten wir es im Kulturfiltrat nicht nachweisen. SCHMITZ (1921) hatte es im Myzel von *Ph. igniarius* bei Anzucht auf Karotten festgestellt. Daraus ist zu schließen, daß es entweder nicht ausgeschieden oder von dem Pilz nur bei Gegenwart eines spaltbaren Substrates gebildet wird. Für die Verwertung der Holzabbauprodukte ist das Enzym offenbar ohne Belang.

Völlig negative Ergebnisse erbrachten die Teste für Glukose-Oxydase (und andere Zucker-Oxydasen), für Oxalsäure-Oxydase sowie α-Hydroxysäure-Oxydasen. Diese Enzyme sind dafür bekannt, daß sie als Flavin-Enzyme Hydroperoxyd während der Oxydation ihres Substrates erzeugen. Ihr Vorkommen ist bei höheren Pflanzen bekannt. Teilweise sind sie auch bei Pilzen nachgewiesen wie die Glukose-Oxydase bei *Penicillium notatum, Fusarium lini, Aspergillus niger* u. a. Arten (s. HOFMANN-OSTENHOF), α-Hydroxysäure-Oxydase bei *Aspergillus fumigatus* u. a. (FRANKE und SCHULZ 1956). Oxalsäure-Oxydase wurde bisher vor allem in Moosen gefunden (NIEKERK-BLOM 1946). Da die Substrate dieser Enzyme während des Holzabbaues entstehen können, lag es nahe zu prüfen, ob durch Oxydation eine extrazelluläre H_2O_2-Bildung auftreten kann. Da die diesbezüglichen Versuche nur negative Ergebnisse erbrachten, muß die Frage unbeantwortet bleiben, auf welchem Wege das für die Funktion der Peroxydase notwendige Hydroperoxyd entsteht. Die Untersuchungen hierüber werden fortgesetzt.

Eine Ausscheidung von Phosphoesterasen und o-Phosphat-Transglykosidasen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Es ist wahrscheinlich, daß noch einige weitere Enzyme extrazellulär während des Holzabbaues auftreten. Aus arbeitstechnischen Gründen war es jedoch nicht möglich, noch mehr Enzyme in den Kreis der Untersuchungen einzubeziehen.

IV. Holzabbau

Der Abbau des Holzes durch holzzerstörende Pilze ist bereits mehrfach chemisch untersucht worden. Durch die bisher vorliegenden Analysen sind die Veränderungen, die das Holz durch den Pilzangriff erfährt, klargestellt worden. Jedoch sind unsere Kenntnisse spezieller Einzelheiten insbesondere über das unterschiedliche Verhalten einzelner Pilzarten recht lückenhaft. Ein Nachteil vieler bisheriger Untersuchungen besteht darin, daß die Analysen nur die Endphase oder ein Zwischenstadium des Abbaues erfassen und der Zeitfaktor zu wenig berücksichtigt wurde. Zwar zeigen bereits die Arbeiten von FALCK und HAAG (1927) sowie CAMPBELL (1930) Ansätze zu einer Erfassung des zeitlichen Verlaufes des Abbaues, jedoch sind die erhaltenen Werte bei FALCK und HAAG nicht genau zu datieren und bei CAMPBELL reichen sie nicht aus, um charakteristische Merkmale einzelner Arten zu erfassen. Aus neuerer Zeit liegen Zeitkurven des Abbaues für Lignin und Zellulose von FAHRAEUS, NILSSON und NILSSON (1949) vor, die *Stereum rugosum, Polyporus abietinus* und *Marasmius scorodonius* untersuchten, ferner von STÖCKLI, der *Marasmius foetidus* auf Buchenlaub kultivierte. Aus den bisherigen Untersuchungen ist ersichtlich, daß die einzelnen Pilzarten in verschiedener zeitlicher Folge und auch in verschiedenem Ausmaß die einzelnen Holzsubstanzen angreifen. Die Zahl der genauer untersuchten Arten ist aber noch so gering, daß eine Gruppierung der Weißfäule-Erreger nach bestimmten Typen verfrüht ist. Selbst die Unterschiede zwischen Braun- und Weißfäule-Erregern sind chemisch gesehen nur insofern ausgeprägt, als erstere das Lignin

nicht nennenswert in Lösung bringen, wenn auch eine chemische Veränderung stattfindet (Leopold 1951). Lösliche Lignin-Derivate können aber auch von Braunfäule-Erregern verwertet werden (Fischer 1953). Die Veränderungen des Alkalilöslichen, in denen Campbell anfänglich ein wichtiges Merkmal sah, unterscheiden die Braunfäule-Erreger nicht grundsätzlich von den Weißfäule-Erregern, was auch aus unseren Untersuchungen hervorgeht.

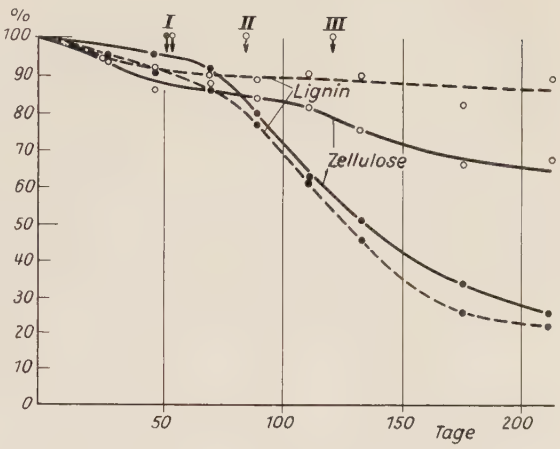


Abb. 8. Verlust der Buchenholzspäne an Lignin und Zellulose infolge des Pilzangriffes. (Gehalt des absolut trockenen, unzersetzten Holzes an Lignin und Zellulose = 100 % gesetzt.)
·———· *Ph. igniarius*, o———o *C. velutipes*

Von unseren Versuchspilzen ist *Phellinus igniarius* ein typischer Weißfäule-Erreger, der vor allem das Kernholz angreift. *C. velutipes* hingegen bevorzugt das Splintholz und ruft eine Zersetzung hervor, die einer Weißfäule nahekommt, aber nicht so typisch ausgeprägt ist. Vermutlich hängt das mit der inkonstanten Laccase-Bildung zusammen. Es war daher interessant, den Holzabbau dieser beiden Arten zu vergleichen.

Die in den Abbildungen 8 und 9 dargestellten Analysenbefunde sind in Gewichtsprozent der Ausgangsmengen der einzelnen Holzbestandteile angegeben. Dadurch kommen die Veränderungen infolge des Abbaues durch die Pilze gut zum Ausdruck. Nachstehend seien die von uns gefundenen Analysenwerte des unzersetzten Buchenholzes (in Abbildungen 8 und 9 gleich 100 % gesetzt) angeführt, um einen Vergleich mit anderen Arbeiten und eine Berechnung der absoluten Werte zu ermöglichen.

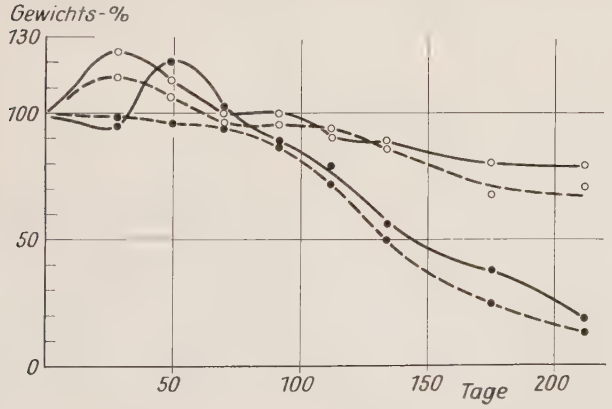


Abb. 9. Veränderung des Pentosangehaltes (unterbrochene Linie) und der Alkalilöslichkeit des Buchenholzes während der Pilzeinwirkung. (Alkalilösliches und bestimmbares Pentosan des unzersetzten Holzes = 100 % gesetzt.)
·———· *Ph. igniarius*, o———o *C. velutipes*

Die Prozentzahlen beziehen sich auf absolut trockenes, unzersetztes Buchenholz, gleicher Vorbehandlung wie die übrigen untersuchten Holzproben.

Die erhaltenen Werte stimmen mit den von anderen Autoren angegebenen recht gut überein. Nur der Zellulosegehalt ist geringer als in den Untersuchungen von CAMPBELL (57 %) und von BARTON, WRIGHT und BOSWELL (1931) (55 %). Andererseits fand STÖCKLI nur 41 % Zellulose. Diese Unterschiede ebenso wie die — allerdings geringeren — Abweichungen in den anderen Analysen-Daten dürften durch die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden zu erklären sein.

Tabelle 1

Analysenwerte für Buchenholz (in Gewichtsprozent)

	%
Zellulose	46,8
Lignin	22,4
Pentosan	18,8
Alkalilösliches	16,4
Heißwasserlösliches	1,38
Alkohol-Benzol-Lösliches	1,30

Tabelle 2

Gehalt der Myzel-Trockensubstanz an Pentosan, Alkali- und Heißwasserlöslichem

	Ph. igniarius %	*C. velutipes* %
Pentosan	8,1	25,27
Alkalilösliches	41,0	16,70
Heißwasserlösliches	11,87	9,47

Da in unseren Versuchen Holz und Pilzmyzel mechanisch nicht zu trennen waren, wurde für das Alkalilösliche, das Pentosan sowie das Heißwasserlösliche des Holzes eine Korrektur vorgenommen. Diese ergibt sich aus den errechneten Myzeltrockengewichten und den nachstehenden Daten. Bei Lignin und Zellulose ist eine solche gewichtsmäßige Korrektur unerheblich, daher wurde sie unterlassen.

Aus den hier angeführten Zahlen sowie den Daten, die den Abbildungen zu entnehmen sind, lassen sich die absoluten Analysenwerte errechnen, weshalb auf ihre ausführliche Wiedergabe verzichtet werden kann.

Zelluloseabbau: Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, wird von beiden Arten bereits frühzeitig die Zellulose angegriffen. Dabei ist *C. velutipes* entsprechend dem rascheren Wachstum zunächst aktiver, während der Abbau durch *Ph. igniarius* später einsetzt, dafür aber wesentlich nachhaltiger ist. Ersterer bewirkt eine Abnahme der Zellulose auf 67,6 % der Ausgangsmenge und letzterer auf 26,1 % bei Versuchsschluß. Merkwürdigerweise entspricht der Zelluloseabbau nicht völlig der Quantität der Cellulase-Bildung, denn *Ph. igniarius* wies ein rascheres und intensiveres Ansteigen der Cellulaseaktivität auf als der andere Pilz (vgl. Abb. 5). Immerhin spiegelt sich die zweigipflige Cellulase-Aktivitätskurve bei *C. velutipes* deutlich im Gang des Zelluloseabbaues wider.

Es ist somit deutlich, daß beide Pilze, obwohl sie zu der Gruppe der Weißfäule-Erreger zu rechnen sind, von Anfang an einen nachweisbaren Zelluloseabbau bewirken.

Ligninabbau: Hierin unterscheiden sich die beiden Arten wesentlich mehr als im Zelluloseabbau. *Ph. igniarius* greift das Lignin etwa in gleichem prozentualem Verhältnis wie die Zellulose an. Man könnte hier von einer echten „Simultanfäule" nach Meier (1955) sprechen, die dem von Campbell (1932) aufgestellten Typ III gleichkommt. Der maximale Ligninabbau beträgt bei *Ph. igniarius* 78 %, bei *C. velutipes* hingegen nur 12 %. Trotz der anfänglich sehr hohen Aktivität der Peroxydase und Laccase bei *Ph. igniarius* kommt der Abbau erst langsam in Gang und verstärkt sich noch, nachdem die Enzymaktivitäten geringer werden. Da bei *C. velutipes* die Abnahme des Ligninanteils ziemlich gering ist, kann man die Frage aufwerfen, ob es sich hierbei um einen echten Abbau handelt, zumal im Kulturfiltrat keine Oxydaseaktivität nachweisbar war. Higuchi, Kawamura und Kawamura fanden bei Buchenholz, das durch *Merulius lacrymans* zersetzt war, einen Ligninschwund von 9 %, wobei der Zellulosegehalt auf 36 % zurückgegangen war. Ohne Zweifel ist dieser Pilz zu den echten Braunfäule-Erregern zu rechnen. Andere Arten dieser Gruppe, die einen geringeren Zelluloseabbau hervorgerufen hatten, bewirkten keinen Ligninschwund. Es ist anzunehmen, daß es sich bei diesem Effekt um ein Beweglichwerden von Ligninsubstanzen niederen Polymerisationsgrades infolge des Zelluloseabbaues handelt. Das geht auch aus den Untersuchungen von Grohn und Schierbaum (1958) an schwinggemahlenem Holz hervor, wo unter der Einwirkung von nicht näher definierten Enzymen von *Aspergillus oryzae* (vermutlich vorwiegend Hemicellulasen und Cellulase) ein Ligninschwund von 8 % beobachtet wurde. Dafür spricht ferner der starke Anstieg des Alkalilöslichen bei Braunfäule-Erregern, an dem Ligninbestandteile zweifellos mitbeteiligt sind. Trotzdem ist es bei *C. velutipes* wahrscheinlich, daß es sich — wenigstens zum Teil — um einen echten Ligninabbau handelt, da ein deutlicher Ligninverlust bereits in den Anfangsstadien des Zelluloseabbaues nachweisbar ist. Der negative Laccasebefund kann — wie bereits erwähnt — durch reduzierende Substanzen oder eine Reaktionsinaktivierung bedingt sein. Wenn auch höchstens mit einer sehr schwachen Aktivität zu rechnen ist, so könnte diese bei der langen Einwirkungszeit doch ausreichen, um einen geringen Ligninabbau hervorzurufen. Freilich muß hierbei erwähnt werden, daß es bisher noch nicht einwandfrei gelungen ist, einen experimentellen Beweis für die Beteiligung der Laccase am Ligninabbau zu erbringen.

Alkalilösliches: Durch die Arbeiten von Falck und Haag, Campbell, Barton, Wright und Boswell sowie Higuchi, Kawamura und Kawamura ist es bekannt, daß die Alkalilöslichkeit der Holzsubstanz durch die Einwirkung der Pilze zunimmt. Das trifft regelmäßig und in starkem Maße für die Braunfäule-Erreger zu, während die Weißfäule-Erreger teils eine Zunahme, teils eine Abnahme bewirken. Wie Campbell (1930) aus seinen Versuchen mit *Polystictus versicolor* schließt, ist dieses unterschiedliche Verhalten darauf zurückzuführen, daß bei den Weißfäule-Erregern die Alkalilöslichkeit nur zu Beginn des Pilzangriffes ansteigt, später aber abnimmt. Da seine Versuche nur zwei zeitliche Auswertungen umfaßten (6 und 10 Wochen), bedarf dieses Phänomen noch eines weiteren Studiums. Durch die in Abbil-

dung 9 wiedergegebenen Zeitkurven wird die Ansicht CAMPBELLS voll bestätigt. Beide Pilzarten verursachen anfänglich einen Anstieg der Alkalilöslichkeit über 100 %. Nach etwa 70tägiger Einwirkung gehen jedoch die Werte unter die des gesunden Holzes zurück. Bei Braunfäule-Erregern bleibt die erhöhte Alkalilöslichkeit länger bestehen und steigt auch stärker an (118 bis 170 % nach HIGUCHI und Mitarbeitern, 225 % nach FINDLAY 1932). Der Effekt wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß das Alkalilösliche Teile des Lignins, des Pektins und der Hemizellulosen enthält. Offenbar werden diese Holzbestandteile durch den fortschreitenden Abbau der Zellulose-Mizellen löslicher und erscheinen in größerer Menge im Alkaliextrakt als in gesundem Holz, sofern sie nicht vom Pilz abgebaut werden. Letzteres trifft bei den Braunfäule-Erregern für das Lignin zu. Nach BARTON, WRIGHT und BOSWELL sollen von *Merulius lacrymans* die aus Xylose und Galaktose bestehenden Holzsubstanzen nicht angegriffen werden, was aber in den Analysen von FALCK und HAAG sowie HIGUCHI und Mitarbeitern keine Bestätigung findet, da dort die Pentosane eine deutliche Abnahme zeigen. Es muß wohl damit gerechnet werden, daß die Braunfäule-Erreger auch die Hemizellulosen verwerten, wobei allerdings der Angriff auf diese Stoffgruppe durch einzelne Pilzarten unterschiedlich stark und auch zeitlich verschieden sein kann. Dafür spricht das Vorkommen einer sehr aktiven Xylanase bei dieser Pilzgruppe (LYR 1959).

Bei unseren Versuchspilzen nimmt mit zunehmendem Lignin- und Pentosanabbau auch die Alkalilöslichkeit ab. *C. velutipes* verhält sich hierin eindeutig wie ein Weißfäule-Erreger, was als Hinweis dafür dienen kann, daß ein echter Ligninabbau erfolgt ist. Bemerkenswert ist die zeitliche Verschiebung des Maximums der Alkalilöslichkeit von *Ph. igniarius* gegenüber *C. velutipes*. Sie läßt sich mit dem später einsetzenden Zelluloseabbau durch den ersten Pilz erklären und kann als Bestätigung der hier vertretenen Auffassung über die Ursache des Phänomens angesehen werden.

P e n t o s a n a b b a u : Der Pentosangehalt des durch *Ph. igniarius* angegriffenen Holzes nimmt kontinuierlich ab und erreicht am Ende des Versuches mit 13,7 % der ursprünglichen Menge seinen tiefsten Wert (Abb. 9). Die Alkalilöslichkeit verläuft vom 70. Tage an gleichsinnig. Bei *C. velutipes* hingegen ist in den ersten 60 Tagen ein deutlicher Anstieg des Pentosangehaltes über den Wert des gesunden Holzes zu beobachten. Dieses Phänomen ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben worden. Da zwei zeitlich aufeinanderfolgende Werte diesen Anstieg zeigen und auch die Einzelanalysen gut übereinstimmten, ist es nicht wahrscheinlich, daß es sich um einen Versuchsfehler handelt. Offenbar wird dieser Effekt durch einen anfänglich starken Zelluloseabbau bei zunächst geringem Angriff auf die Pentosane hervorgerufen. Vermutlich wurde dadurch ein Teil der in gesundem Holz nicht bestimmbaren (evtl. an Zellulose gebundenen) Pentosane freigesetzt, und damit einer Bestimmung mit der angewandten Methode zugänglich. Sobald der Pentosanabbau durch den Pilz stärker wird, verschwindet der Effekt wieder, was auch der Grund sein dürfte, weshalb dieses Phänomen bisher nicht beobachtet wurde. Bei *Ph. igniarius* ist der Zelluloseabbau anfänglich

geringer und wahrscheinlich zugleich mit einem stärkeren Angriff auf die Pentosane verbunden, wodurch kein Anstieg des Pentosangehalts zu beobachten ist. Wie bereits erwähnt, verfügen beide Pilzarten über eine aktive Xylanase und stehen in dieser Hinsicht den Braunfäule-Erregern nicht nach. Es fällt auf, daß der Anstieg im Pentosangehalt zeitlich mit dem Anstieg des Alkalilöslichen bei *C. velutipes* zusammenfällt, was auf eine gleichartige Ursache schließen läßt.

Heißwasserlösliches: Das Heißwasserlösliche ist bei beiden Pilzen fast während der gesamten Versuchsdauer deutlich erhöht und erreicht Werte bis zu 238 % und 261 % gegenüber dem unzersetzten Holz (s. Tab. 3). Gegen Ende des Versuches sinken die Werte etwas ab, gehen aber nicht wesentlich unter den Ausgangswert. Das steht im Einklang mit den Befunden anderer, bereits erwähnter Autoren, die ebenfalls einen Anstieg des Heißwasserlöslichen infolge des Pilzangriffes feststellen konnten. Offenbar handelt es sich um Abbauprodukte verschiedener Art, die durch die Enzymeinwirkung entstanden sind. Barton, Wright und Boswell fanden Glukose als wesentlichen Bestandteil des Wasserextraktes. Wahrscheinlich werden — zumindest anfänglich — mehr lösliche Kohlenhydrate freigesetzt als der Pilz verwerten kann. Das äußerte sich in unseren Versuchen in einem Anstieg des Reduktionswertes im Kulturfiltrat (Abb. 3).

Alkohol-Benzol-Lösliches: Auch diese Fraktion weist bei beiden Pilzen einen kräftigen Anstieg über den Kontrollwert auf (s. Tab. 3). Die Maximalwerte betragen bei *Ph. igniarius* 165 % und bei *C. velutipes* 180 %. Bei letzterem bleibt während der gesamten Versuchszeit eine Erhöhung auf etwa 140 % erhalten, während bei der ersten Art nach 180 Tagen die Werte auf 60 % zurückgehen. Möglicherweise hängt das mit dem intensiveren Ligninabbau zusammen. Ein Anstieg dieser Fraktion ist auch aus den Analysendaten von Barton, Wright und Boswell, Findlay sowie Higuchi und Mitarbeitern zu ersehen. Welcher Art die freiwerdenden Substanzen im einzelnen sind, ist noch unklar. Vermutlich ist der Anstieg auf eine größere Löslichkeit von Teilen des Lignins infolge des Zelluloseabbaues zurückzu-

Tabelle 3

Veränderung des Heißwasser- und Alkohol-Benzol-Löslichen infolge des Pilzangriffes
(Werte des unzersetzten Holzes = 100 %)

Tage	Heißwasserlösliches		Alkohol-Benzol-Lösliches	
	Ph. igniarius %	*C. velutipes* %	*Ph. igniarius* %	*C. velutipes* %
28	89	261	74	151
49	117	145	106	136
70	205	137	101	137
91	215	141	112	180
112	238	133	114	146
133	191	136	165	153
175	140	191	70	127
212	88	210	71	153

führen (s. Schubert 1954). Diese Deutung würde unseren Befunden gut entsprechen. (Verzögerter Anstieg bei *Ph. igniarius* wegen anfänglich langsamen Zelluloseabbaues, später Abnahme wegen intensiven Ligninabbaues. Bei *C. velutipes* sofortige und anhaltende Zunahme infolge des anfangs raschen Zellulose- und des geringen Ligninabbaues.)

V. Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen ermöglichen es, Pilzwachstum, Holzabbau und Enzymausscheidung im Zusammenhang zu betrachten.

Die Enzymproduktion ist nicht dem Myzelwachstum proportional, sondern steht eher in einem umgekehrten Verhältnis, oder verläuft unabhängig. Dieser Effekt läßt sich nur zu einem geringen Teil durch die schlechtere Extrahierbarkeit der Enzyme im fortgeschrittenen Stadium des Abbaues erklären. Durch freiwerdende Abbauprodukte wird bekanntlich bei vielen Enzymen die Aktivität gehemmt und auch die Bildung verringert. Zwar läßt sich aus den Abbildungen 4 bis 7 nicht ohne weiteres die Enzymproduktion ablesen, da es sich um Aktivitätskurven handelt, jedoch ist anzunehmen, daß bei den relativ langen Zeiträumen, die zwischen den einzelnen Auswertungen liegen, der Kurvenverlauf eine wechselnde Produktion der Enzyme widerspiegelt. Eine exakte Auswertung wird freilich dadurch erschwert, daß wir nichts über die Beständigkeit der einzelnen Enzyme in einem solchen komplexen System wissen.

Das Spektrum der Ektoenzyme umfaßt vor allem diejenigen Enzyme, die unmittelbar am Aufschluß der unlöslichen Holzsubstanzen beteiligt sind. Ihre Bildung ist bei den Holzzerstörern weitgehend konstitutiv festgelegt (Lyr 1959), so daß aus ihrem Auftreten nicht ohne weiteres ein Schluß auf eine entsprechende Funktion beim Holzabbau berechtigt ist (z. B. Amylase). Es fällt auf, daß mit Ausnahme der Oxydasen und der Tannase keine Enzyme auftraten, die bevorzugt lösliche Substrate umsetzen. Diese sind offenbar, sofern sie beim Holzabbau überhaupt gebildet werden, intrazellulär lokalisiert. Die Zweckmäßigkeit für den Pilz ist leicht einzusehen, da der für die Eiweißsynthese notwendige Stickstoff im Holz — ganz besonders im Kernholz — ein begrenzender Faktor ist. Es ist zu vermuten, daß auch die Oxydasen unlösliche Verbindungen angreifen können, wenngleich ein Beweis hierfür noch aussteht.

Ein Vergleich der Cellulase-Aktivität mit dem Zellulose-Abbau zeigt, daß keine quantitative Parallelität vorhanden ist. Bei näherer Überlegung ist eine solche auch nicht zu erwarten. Nach Norkrans und Ranby (1956) sowie Schäfer ist eine wahllose Spaltung der Zellulose-Bindungen anzunehmen, wobei anfangs hochmolekulare Spaltprodukte entstehen, die mit der angewandten Bestimmungsmethode noch als Zellulose erfaßt werden. Dadurch muß — selbst bei gleichbleibender Enzymaktivität — der „Abbau" mit fortschreitender Dauer der Enzymeinwirkung immer stärker werden. In einem späteren Stadium genügt eine geringere Enzymaktivität, um einen starken „Zelluloseverlust" zu bewirken. Vielleicht führen auch die zunehmende Löslichkeit der Zellulose-Derivate und die fortschreitende Destruktion des Mizel-

largerüstes zu einer größeren Wirksamkeit des enzymatischen Angriffes (vgl. Freudenberg und Ploetz 1940). Wenn auch der Abbau des Lignins in anderer Weise verläuft, liegen wahrscheinlich prinzipiell die gleichen Verhältnisse zugrunde. Unter der Einwirkung verschiedener Enzyme muß es zu einer Öffnung der Ringsysteme und zu einer Sprengung der Makromoleküle kommen, was vermutlich ebenso wie bei der Zellulose nicht nur von den Enden her geschieht. Dadurch kann — trotz hoher Enzymaktivität — ein Abbau nur langsam in Gang kommen, später sich aber wesentlich verstärken, auch wenn die enzymatische Aktivität abnimmt. Über ligninabbauende Enzyme ist noch nichts Genaues bekannt. Wahrscheinlich spielen aber Polyphenol-Oxydasen eine gewisse Rolle, worauf die enge Korrelation zwischen der Fähigkeit zum Ligninabbau und dem Besitz an Oxydasen bei höheren Pilzen hinweist (vgl. Lyr 1958 a). Als solche konnten nur Peroxydase und Laccase nachgewiesen werden. Gottlieb und Geiler (1949) gaben an, ein spezifisches, Lignin oxydierendes Enzym bei *Psalliota campestris* gefunden zu haben. Diese Annahme erscheint uns nach den bisher vorliegenden Befunden noch nicht erwiesen, da das beschriebene Rohenzym mit Laccase identisch sein kann, die reichlich von diesem Pilz gebildet wird. Bei der ausgesprochenen Unspezifität der bisher bekannten extrazellularen Oxydasen ist es wenig wahrscheinlich, daß ein spezifisches Enzym für die Ligninoxydation existiert, zumal das Laubholzlignin keine einheitliche Verbindung, sondern ein Mischpolymerisat darstellt (vgl. Freudenberg 1954). Es wäre zu erwarten, daß ein solches Enzym sich durch ein höheres Oxydationspotential gegenüber Peroxydase und Laccase auszeichnet, wodurch es jedoch bei den bisher durchgeführten Untersuchungen hätte auffallen müssen. Nach den derzeitigen Kenntnissen kann eine teilweise Ligninoxydation als Vorstufe für einen weiteren Abbau ohne weiteres in den Wirkungsbereich der bekannten Oxydasen fallen. Versuche, einen experimentellen Beweis hierfür zu erbringen, ergaben teils positive (Dion 1951, Van Vliet 1954), teils negative Resultate (Higuchi, Kawamura und Hayaschi 1956), so daß eine endgültige Klärung noch aussteht. Eigene Untersuchungen zu diesem Problem sind in Vorbereitung.

Der Beteiligung der Peroxydase an einer ektoenzymatischen Ligninoxydation steht bisher der negative Nachweis einer extrazellulären Peroxydbildung entgegen. Obwohl verschiedene gekoppelte Reaktionen denkbar sind, die zu einer Hydroperoxydbildung führen, ließ sich bisher kein solches System in den Kulturfiltraten auffinden. Bei einem Vergleich der Peroxydase- mit der Laccase-Aktivität ist zu beachten, daß diese durch die Testbedingungen stark beeinflußt wird. Der Peroxydase steht im Labortest eine relativ hohe Hydroperoxydkonzentration (0,075 % Endkonzentration) zur Verfügung, was den Substratumsatz stark beschleunigt. In vivo dürfte die Peroxydkonzentration geringer sein, so daß der Laccase eine größere Bedeutung zukommen kann, als es bei einem Blick auf Abbildung 4 scheinen mag. Auf die Problematik einer Deutung des Fehlens bzw. Verschwindens der Laccase-Aktivität wurde bereits hingewiesen.

Es ist zweifellos reizvoll, zur Charakterisierung des Pilzangriffes aus den Werten für den Lignin- und den Zellulose-Abbau einen Quotienten zu

bilden, wie es LINDEBERG (1946), STÖCKLI (1952) sowie HIGUCHI, KAWAMURA und KAWAMURA (1955) getan haben. LINDEBERG weist bereits darauf hin, daß es sich hierbei nicht um eine Konstante handelt, sondern daß der Wert von den Ernährungsbedingungen und der Einwirkungszeit abhängig ist. Zu dem gleichen Ergebnis kommt auch STÖCKLI, so daß es fraglich erscheint, ob diesem zahlenmäßigen Ausdruck überhaupt eine Bedeutung zukommt. Aus unseren Werten ist zu ersehen, daß sich im Laufe der Zeit das Verhältnis von Lignin- und Zellulose-Abbau sehr verschieben kann (s. Tab. 3), was besonders für *C. velutipes* zutrifft, der mit zunehmender Zeit immer stärker zu den Braunfäule-Erregern tendiert.

Tabelle 4

Verhältnis des prozentualen Lignin- und Zellulose-Abbaues

$$(Q = \frac{L\,\%}{C\,\%})$$

von

Ph. igniarius und *C. velutipes*

Zeit in Tagen	*Ph. igniarius*	*C. velutipes*
28	0,89	0,90
49	1,35	0,69
70	1,68	0,73
91	1,16	0,71
112	1,00	0,49
133	1,12	0,45
175	1,11	0,41
212	1,05	0,37
Mittelwert	1,13	0,60

Immerhin weist der ziemlich hohe Durchschnittswert den Pilz eindeutig als Weißfäule-Erreger aus. *Merulius lacrymans* erreichte nach HIGUCHI und Mitarbeitern nur einen Wert von 0,14, der für einen Braunfäule-Erreger schon als sehr hoch betrachtet werden muß. Infolge der großen Variabilität dieses Quotienten, die besonders in den Angaben von STÖCKLI zum Ausdruck kommt, kann diesem nicht mehr als eine informatorische Bedeutung zugemessen werden. Bei den großen Schwankungen, die STÖCKLI auf verschiedenen Substraten fand, ist es sogar fraglich, ob er in Grenzfällen zur Unterscheidung von Weiß- und Braunfäule-Erregern verwendet werden kann.

Obwohl bei *Ph. igniarius* der Abbau fast das Endstadium erreicht und die restliche Holzsubstanz eine weißliche Färbung angenommen hatte, war das Verhältnis von Lignin zu Zellulose nicht wesentlich verändert. Es ist daher nicht berechtigt, den Weißfäule-Erregern einen bevorzugten Ligninabbau zuzuschreiben. Die „Weißfäule" wird in erster Linie durch den oxydativen Abbau von bräunlich gefärbten Gerbstoffen und anderen oxydierten Polyphenol-Derivaten hervorgerufen, ist daher ein Bleichungseffekt, durch den die prozentuale Zusammensetzung des Holzrückstandes an Lignin, Zellulose, Pentosan u. a. nicht verändert zu werden braucht. Selbstverständlich kann das der Fall sein, wenn die Pilzarten eine einseitig bevorzugte Enzymproduktion aufweisen sollten. Jedoch scheint das nicht übermäßig häufig zu sein. Die Fähigkeit zum Zellulose-Abbau tritt bereits bei den niederen Pilzen und bei gewissen Bakterien auf und es ist verständlich, daß sie auch bei den höheren Pilzen — mit Ausnahme gewisser Ernährungsspezialisten — allgemein verbreitet ist. Dem entspricht das frühzeitige Auftreten von Zellulose in der Phylogenie der Pflanzen. Lignin ist demgegenüber erst bei den Cormophyten anzutreffen und die Fähigkeit zu seinem Abbau scheint nach den bisherigen

Kenntnissen vorwiegend auf einen Teil der Basidiomyceten beschränkt zu sein, die diese accessorische Fähigkeit zusätzlich zu der Cellulase-Bildung entwickelt haben, wodurch sie gegenüber den übrigen Mikroorganismen den Vorteil besitzen, auf eine große, sonst ungenutzte Nährstoffreserve zurückgreifen zu können.

Für die sorgfältige und umsichtige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie bei ihrer Auswertung danken wir Frau M. Pflaumbaum, Frl. B. Rogge sowie Frau U. Bohn und Frau Ch. Schäge.

Zusammenfassung

1. Der Abbau von Buchenholz und die Bildung von Ektoenzymen durch die beiden Pilze *Phellinus igniarius* und *Collybia velutipes* sowie die Myzelproduktion und die Veränderungen des Kulturfiltrates wurden über einen Zeitraum von 212 Tagen verfolgt.

2. Der Angriff auf das Holz erfolgt polyenzymatisch. Bei *Ph. igniarius* konnten folgende Ektoenzyme festgestellt werden:

Peroxydase, Laccase, Cellulase, Pektinase, Pektase, Amylase und Tannase. Bei *C. velutipes*: Cellulase, Pektinase, Pektase, Amylase und Proteinase.

3. Im Kulturfiltrat beider Pilze waren nicht nachweisbar: Cellobiase, Saccharase, Glukose-Oxydase (und andere Zuckeroxydasen), α-Hydroxysäure-Oxydase, Oxalsäure-Oxydase, Phosphoresterase sowie Orthophosphat-Transglukosidasen. Demnach werden beim Holzabbau fast ausschließlich Enzyme ausgeschieden, die dem Aufschluß der unlöslichen Holzsubstanzen dienen.

4. Die höchste Enzymaktivität wurde in den ersten 70 Tagen des Pilzangriffes beobachtet. In diesem Zeitraum waren Myzelbildung und Holzabbau noch unbedeutend. Mit zunehmender Myzelentwicklung und mit dem Auftreten von Abbauprodukten gingen die Enzymaktivitäten zurück. Trotzdem war ein unvermindert starker Abbau der Holzbestandteile nachweisbar, was durch die besondere Art des Abbaues der hochpolymeren Substanzen erklärbar ist.

5. Entsprechend der geringeren Enzymaktivität bewirkte *C. velutipes* einen schwächeren Holzabbau als *Ph. igniarius*.

6. Die beiden Pilze unterschieden sich besonders durch den Ligninabbau, der bei *Ph. igniarius* wesentlich stärker war. Dem entsprach eine hohe Aktivität von Peroxydase und auch von Laccase.

7. Beide Pilzarten rufen anfänglich einen deutlichen Anstieg des Alkalilöslichen hervor, der infolge des Abbaues der alkalilöslichen Substanzen bald in eine Abnahme übergeht. Bei *C. velutipes* konnte außerdem ein Anstieg der Pentosanwerte zu Beginn des Pilzangriffes beobachtet werden, was auf eine Maskierung oder chemische Bindung eines Teiles der Pentosane mit anderen Holzbestandteilen im gesunden Holz hindeutet.

8. Der Zellulose-Abbau durch die beiden Pilze, die als Weißfäule-Erreger anzusehen sind, verläuft gleichzeitig mit dem Abbau der übrigen Holzsubstanzen. Wahrscheinlich ist er für die unter Punkt 7 beschriebenen Effekte verantwortlich. Ein bevorzugter Abbau des Lignins wurde nicht festgestellt.

Summary

1. Rotting of beech wood and the formation of ectoenzymes by the two fungi *Phellinus igniarius* and *Collybia velutipes*, together with mycelium formation and the changes occuring in the culture filtrate were followed over a period of 212 days.

2. The wood is attacked polyenzymatically. For *Ph. igniarius* the following ectoenzymes were demonstrated: peroxidase, laccase, cellulase, pectinase, pectase, amylase and proteinase.

3. In the culture filtrates from both fungi no trace could be found of: cellobiase, saccharase, glucose-oxidase (and other sugar oxidases) α-hydroxy-acid-oxidase, oxalic-acid-oxidase, phosphoresterase or orthophosphate-transglucosidases. Consequently in rotting of the wood the enzymes secreted are almost exclusively those that serve to split the insoluble constituents of the wood.

4. The highest enzyme activity was observed in the first 70 days of the fungal attack. In this period mycelium formation and rotting of the wood were still slight. As mycelial development increases and the decomposition products appear the enzyme activity diminishes. Nevertheless the decomposition of the wood constituents continues on an undiminished scale, which can be explained by the particular nature of the decomposition of highly polymerized substances.

5. In consequence of its lower enzyme activity *C. velutipes* caused less decomposition than *Ph. igniarius*.

6. The two fungi are distinguished particularly by the decomposition of lignin which is considerably higher in *Ph. ignarius*. Corresponding to this there was a high activity of peroxidase and laccase.

7. Both fungi caused a clear increase of alkali-soluble substances at the beginning, which as a result of the decomposition of the alkali-soluble substances soon changed to a decrease. In *C. velutipes* a rise in the pentosan values could also be observed at the beginning of the fungal attack, which indicates a masking or chemical combination of part of the pentosans with other wood constituents in the healthy wood.

8. The decomposition of cellulose by the two fungi, both of which can be regarded as organisms causing white rot, occurs concurrently with the decomposition of the other wood constituents. It is probably responsible for the effects described under item 7. No preferential decomposition of lignin was observed.

Literaturverzeichnis

BARTON-WRIGHT, E. C., and J. G. BOSWELL, 1931: An investigation of the products of decay of spruce wood rotted by *Merulius lacrymans*. Biochem. J. **25**, 494—506.

BENTLEY, R., 1955: Glucose aerodehydrogenase (glucose oxidase), In Methods in Enzymology I. ed. by S. COLOWICK and N. O. KAPLAN, Acad. Press Inc. New York, 340—345.

BERNFELD, P., 1955: α- and β-Amylases. In Methods in Enzymology Vol. I (l. c.), 149—158.

BOCK, H., 1941: Polyuronidasen. In: Methoden der Fermentforschung. Herausgegeben von E. BAMANN und K. MYRBÄCK. Verlag Thieme, Leipzig, S. 1914—1923.

BOSE, S. R., 1939: Enzymes of wood-rotting fungi. Ergebnisse d. Enzymforschung **8**, 267—276.

— —, and S. N. Sarkar, 1937: Enzymes of some wood-rotting Polypores. Proc. Roy. Soc. B. **123**, 193—213.

Campbell, W. G., 1930: The effect on wood substance of *Polystictus versicolor* (L.) Fr. Biochem. J. **24**, 1235—1243.

— —, 1931: The effect on wood substance of *Armillaria mellea* Fr., *Polyporus hispidus* Fr. and *Stereum hirsutum* Fr. Biochem. J. **25**, 2023—2027.

— —, 1932: The effect on wood substance of *Ganoderma applanatum* Pat., *Fomes fomentarius* Fr., *Polyporus adustus* Fr., *Pleurotus ostreatus* Fr., *Armillaria mellea* Fr., *Trametes pini* Fr. and *Polystictus abietinus* Fr. Biochem. J. **26**, 1829—1838.

Dion, W. M., 1951: Production and properties of a polyphenol oxidase from the fungus *Polyporus versicolor*. Canad. J. Bot. **30**, 9—21.

Doudoroff, M., 1955: Disaccharide Phosphorylases. In Methods in Enzymology, Vol. I (l. c.), 225—231.

Fahraeus, G., R. Nilsson and G. Nilsson, 1949: Studies in the decomposition of wood by means of some white rot fungi. Svensk Bot. Tidskr. **43**, 343—356.

— —, V. Tullander and H. Ljunggren, 1958: Production of high laccase yields in cultures of fungi. Physiol. Plant. **11**, 631—643.

Falck, R., 1926: Über korrosive und destructive Holzzersetzung und ihre biologische Bedeutung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **44**, 652—664.

— —, und W. Haag, 1927: Der Lignin- und der Cellulose-Abbau des Holzes, zwei verschiedene Zersetzungsprozesse durch holzbewohnende Fadenpilze. Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **60**, 225—232.

Findlay, W. P. K., 1932: A study of *Paxillus panuoides* Fr. and its effects upon wood. Ann. Appl. Biol. **19**, 331—369.

Fischer, G., 1953: Untersuchungen über den biologischen Abbau des Lignins durch Mikroorganismen. Arch. f. Mikrobiol. **18**, 397—424.

Franke, W., und I. Schulz, 1956: Oxydationsfermente aus Schimmelpilzen. I. Über die Glykolico-Dehydrase der Schimmelpilze. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 30—57.

Freudenberg, K., 1954: Neuere Ergebnisse auf dem Gebiete des Lignins und der Verholzung. Fortschr. d. Chem. org. Naturst. **11**, 43—82.

— —, und Th. Ploetz, 1940: Über enzymatische Abbauversuche an Holz. Holz als Roh- u. Werkst. **3**, 105—109.

Garren, K. H., 1938: Studies on *Polyporus abietinus*. I. The enzyme-producing ability of the fungus. Phytopathology **28**, 839—845.

Gäumann, E., und E. Böhni, 1947: Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen. Helv. Chim. Acta **30**, 24—38.

Grohn, H., und F. Schierbaum, 1958: Enzymatische Abbauversuche an schwinggemahlenem Holz und Zellstoff. Holzforschung **12**, 65—73.

Gottlieb, S., and J. H. Geller, 1949: Enzymatic decomposition of lignin. Science **110**, 189—190.

Higuchi, T., I. Kawamura and H. Kawamura, 1955: Properties of the lignin in decayed wood. J. Jap. Forestry Soc. **37**, 298—303.

— —, — —, and I. Hayashi, 1956: The enzymatic oxidation of lignin. J. Jap. Wood Res. Soc. **2**, 31—35.

Hoffmann-Ostenhof, O., 1954: Enzymologie. Springer-Verlag, Wien.

Jullander, I., 1952: Physico-chemical properties of ethyl-hydroxyethyl cellulose. Svensk Papperstidning **55**, 197—211.

Karström, H., 1938: Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismen. Ergebnisse d. Enzymforschung **7**, 350—376.

Koch, R. B., and C. G. Ferrari, 1955: Investigation of proteolytic enzymes by a gelatin viscosity technic. Cereal Chemistry **32**, 254—269.

Leopold, B., 1951: Studies on Lignin. Part. VIII. Svensk Kem. T. **63**, 260—271.

Lindenberg, G., 1944: Über die Physiologie ligninabbauender Bodenhymenomyceten. Symb. Bot. Upps. **8**, 1—183.

Lindenberg, G., 1946: On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil-inhabiting hymenomycetes. Ark. f. Bot. **33**, 1—16.

Lyr, H., 1956: Untersuchungen über die Peroxydasen höherer Pilze. Planta **48**, 239—265.

— —, 1957: Ein neues Peroxydase-Bestimmungsverfahren. Biochem. Z. **329**, 91—96.

— —, 1958 a: Über den Nachweis von Oxydasen und Peroxydasen bei höheren Pilzen und die Bedeutung dieser Enzyme für die Bavendamm-Reaktion. Planta **50**, 359—370.

— —, 1958 b: Die Induktion der Laccase-Bildung bei *Collybia velutipes* Curt. Arch. f. Mikrobiol. **28**, 310—324.

— —, 1959: Die Bildung von Ektoenzymen durch holzzerstörende und holzbewohnende Pilze auf verschiedenen Nährböden. Arch. f. Mikrobiol. (im Druck).

— —, und H. Ziegler, 1959: Die Wirkung von Penta-Chlorphenol auf Enzymausscheidung und Holzabbau von holzzerstörenden Pilzen. (In Vorbereitung.)

Mandels, M., and E. T. Reese, 1957: Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. J. Bact. **73**, 269—278.

Meier, H., 1955: Über den Zellwandabbau durch Holzvermorschungspilze und die submikroskopische Struktur von Fichtentracheiden und Birkenholzfasern. Holz als Roh- u. Werkst. **13**, 323—338.

Nicholson, W. N., M. Nierenstein, J. C. Pool and N. V. Price, 1931: The Action of tannase on gallotannin. Biochem. J. **25**, 752—755.

Niekerk-Blom, C. J., 1946: Notes on the oxidation of oxalic acid by mosses. Proc. Kongl. Nederl. Akad. Wet. **49**, 1096—1100.

Norkrans, B., 1957: Studies of β-glucoside- and cellulose-splitting enzymes from different strains of *Collybia velutipes*. Physiol. Plant. **10**, 454—466.

— —, and B. Ranby, 1956: Studies of the enzymatic degradation of cellulose. Physiol. Plant. **9**, 198—211.

Paech, S., und M. V. Tracey, 1956: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Bd. I. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen.

Roboz, E. R., W. Barratt and E. L. Tatum, 1952: Breakdown of pectic substances by a new enzyme from Neurospora. J. Biol. Chem. **195**, 459—471.

Rypáček, V., 1957: Biologie dřevokazných hub. Verl. d. Tschechoslow. Akad. Wiss. Prag.

Sandermann, W., 1956: Grundlagen der Chemie und chemischen Technologie des Holzes. Akad. Verl. Ges., Leipzig.

Schaefer, A. Ch., 1957: Über die Bildung und Wirkung eines cellulosespaltenden Fermentes aus Schimmelpilzen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **67**, 218—270.

Schmidt, O. Th., 1941: Tannase. Methoden der Fermentforschung von E. Bahmann und K. Myrbäck. Verl. Thieme, Leipzig, 1590—1598.

Schmitz, H., 1921: Studies in wood decay. II. Enzyme action in *Polyporus volvatus* Peck and *Fomes igniarius* (L.) Gillet. J. Gen. Physiol. **3**, 795—800.

Schubert, W. J., 1954: Über Lignin und Lignifizierung. Holz als Roh- u. Werkst. **12**, 373—377.

Schwalbe, C., und R. Sieber, 1931: Die chemische Betriebskontrolle in der Zellstoff- und Papierindustrie. III. Aufl., S. 115—116. Springer-Verl. Berlin.

Siebel, E., 1953: Handbuch der Werkstoffprüfung. II. Aufl. Springer-Verl. Berlin.

Smirnova, L. S., 1957: The adaptive character of amylase in *Aspergillus oryzae*. (Russ.) Mikrobiologija **26**, 45—51.

Stöckli, A., 1952: Über den Abbau von Lignin, Zellulose und Hemizellulosen durch Pilze. Diss. TH. Zürich.

Stone, B. A., 1957: Complexity of β-glucanases from *Aspergillus niger*. Biochem. J. **66**, 1—2.

Sumner, I. B., and G. F. Somers, 1949: Laboratory Experiments In Biological Chemistry. Academic Press Inc., Publishers New York N. Y.

Van Vliet, W. F., 1954: The enzymic oxidation of lignin. Biochem. et Biophys. Acta **15**, 211—216.

Ziegler, H., 1957: Über die physiologischen Grundlagen der Wirkung des Insektizids E 605 auf den pflanzlichen Organismus. Biolog. Zbl. **76**, 43—69.

Kurze Mitteilungen

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusserologie und Institut für landwirtschaftliche Virusforschung, Braunschweig

Verwandtschaft zwischen dem Stauchevirus der Erbse und dem Rotkleeadernmosaik-Virus (red clover vein mosaic virus)

Von

C. Wetter, L. Quantz und J. Brandes

Mit einer Abbildung

Zu den in Deutschland verbreiteten Erbsenviren gehört nach Quantz (7) das Stauchevirus der Erbse, das von Quantz und Brandes (8) 1957 erstmalig kurz erwähnt wurde. Das Symptombild auf Erbse, der Wirtskreis und die Eigenschaften des Stauchevirus zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit dem von Hagedorn und Walker (4) beschriebenen Wisconsin pea stunt-Virus, das nach Hagedorn und Hanson (3) mit dem red clover vein mosaic-Virus Osborn (6) identisch ist.

Serologische Untersuchungen, über die hier kurz berichtet wird, bestätigen die von Quantz (7) angenommene nahe Verwandtschaft zwischen dem red clover vein mosaic-Virus und dem Stauchevirus der Erbse. Es bestehen lediglich Unterschiede in der Symptomausbildung auf einigen Wirtspflanzen.

Antiseren gegen das Stauchevirus der Erbse (EKV) und das amerikanische red clover vein mosaic-Virus (RCVMV) wurden kreuzweise gegen die entsprechenden Antigene getestet. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen im Präzipitationstest wurde der Preßsaft infizierter Erbsen für 10 min auf 45 °C erhitzt und anschließend 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Antiseren (jeweils 0,5 ml) wurden gegen Antigenverdünnungen von $^1/_8$ bis $^1/_{256}$ (jeweils 0,5 ml) in Röhrchen bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C getestet. Von mehreren Versuchen sind die höchsten, nach 60 min erreichten Titer angeführt (Tab. 1). Serologisch sind hiernach EKV und RCVMV nicht zu unterscheiden. Auch ein in Holland hergestelltes Antiserum gegen das red clover vein mosaic-Virus reagierte mit dem Stauchevirus bis zur gleichen Verdünnung wie mit dem Isolat aus USA.

Tabelle 1

Antiserum	Antigen	
	EKV	RCVMV
EKV	2048	4096
RCVMV	2048	2048
RCVMV Holland	256	256

Wie bereits mitgeteilt (9), reagiert das EKV-Antiserum in schwächerem Maße auch mit dem von QUANTZ und BRANDES (8, 1) beschriebenen Virus aus Steinklee (SKV). Dieses Steinkleevirus gehört nach WETTER und QUANTZ (9) zur Gruppe der pea streak-Viren. Nach diesem Befund war zu erwarten, daß auch das amerikanische Wisconsin pea streak-Virus und das Idaho streak-Virus (ISV) (5) mit dem RCVMV verwandt sind. Wir prüften daher verschiedene amerikanische und deutsche Isolate der streak- und stunt-Viren wechselseitig gegen die heterologen Antiseren. In allen Fällen wurden schwache positive serologische Reaktionen erhalten, die für eine Verwandtschaft zwischen streak- und stunt-Viren sprechen. Da allerdings bisher keine Spezialwirte gefunden wurden, durch die sich beide Virusgruppen mit Sicherheit trennen lassen, kann eine beiderseitige Verunreinigung nicht völlig ausgeschlossen werden. Gegen eine derartige Einschränkung spricht aber, daß die an verschiedenen Orten hergestellten Antiseren mit jedem der heterologen Partner präzipitieren.

Die Frage, ob die benutzten Virusisolate tatsächlich rein sind, ist deshalb bedeutungsvoll, weil zwischen beiden Gruppen Unterschiede in der Normallänge bestehen. Für die elektronenmikroskopische Darstellung wurden EKV und RCVMV von verschiedenen Wirtspflanzen exsudiert und die photographischen Aufnahmen nach den Angaben von BRANDES und PAUL (2) ausgewertet. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Virus	Wirtspflanze	Anzahl der vermessenen Teilchen	Normallänge in mμ
RCVMV	*Pisum sativum*	249	652
EKV	*Pisum sativum*	242	656
	Vicia faba	538	654
	Trifolium incarnatum	180	656
	Chenopodium quinoa	134	659
	Gesamt	1343	655

In der Abbildung 1 ist die gemeinsame Verteilungskurve der Partikellängen beider Virusisolate wiedergegeben. Für die stunt-Viren ergibt sich somit eine Normallänge von 655 mμ. Dieser Wert unterscheidet sich deutlich von den für die streak-Viren ermittelten Daten. Für das SKV wurde eine Normallänge von 617 mμ angegeben (1); die des ISV bestimmten wir zu 614 mμ (Mittelwert aus 214 Einzelmessungen). Dagegen wurden keine Unterschiede in der Dicke der Teilchen gefunden, die für beide Virusgruppen bei 12—13 mμ liegt.

Sollten sich unsere Befunde bestätigen lassen, wäre damit erstmalig gezeigt, daß serologisch verwandte Viren eine unterschiedliche Normallänge aufweisen können. Wir führen zur Zeit entsprechende Untersuchungen durch und werden an gleicher Stelle ausführlich darüber berichten.

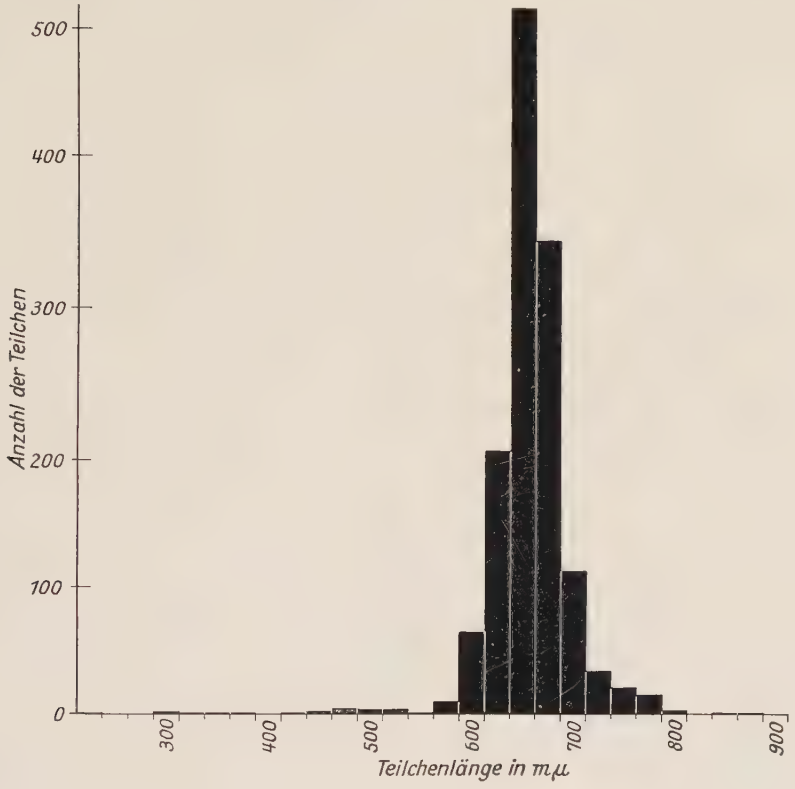


Abb. 1. Häufigkeitsverteilung der Längen des Rotkleeadernmosaik-Virus

In Zukunft bezeichnen wir die Viren der pea stunt-Gruppe, also auch das deutsche Stauche-Virus, als red clover vein mosaic virus (Rotkleeadernmosaik-Virus). Die Viren der pea streak-Gruppe: das deutsche Steinkleevirus, das Wisconsin pea streak-Virus und das Idaho streak-Virus, fassen wir unter der Bezeichnung pea streak virus (Erbsenstrichel-Virus) zusammen.

Wir danken Herrn Prof. Dr. D. J. Hagedorn, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, USA, der uns das red clover vein mosaic virus zur Verfügung stellte, und Herrn Dr. L. Bos, Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen, Holland, der uns ein Antiserum gegen das holländische Isolat RK 5 des RCVMV (als „RCVMV Holland" bezeichnet) überließ.

Summary

Comparative serological studies gave evidence that the German pea stunt virus is closely related to the red clover vein mosaic virus. The viruses are rod shaped with a normal length of 655 mμ and a diameter of about 12—13 mμ. Relationship between red clover vein mosaic virus and pea streak virus is supposed.

Literaturverzeichnis

1. Brandes, J., und H. L. Paul, 1957: Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virosen. Arch. Mikrobiol. **26**, 358—368.
2. — —, und L. Quantz, 1957: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Weißkleevirus und des Steinkleevirus. Arch. Mikrobiol. **26**, 369—372.
3. Hagedorn, D. J., and E. W. Hanson, 1951: A comparative study of the viruses causing Wisconsin pea stunt and red clover vein mosaic. Phytopathology **41**, 813—819.
4. — —, and J. C. Walker, 1949: Wisconsin pea stunt, a newly described disease. J. Agric. Res. **78**, 617—626.
5. Kim, W. S., 1958: Studies with several streak inciting viruses of pea. Thesis, University of Wisconsin, Madison.
6. Osborn, H. T., 1937: Vein mosaic of red clover. Phytopathology **27**, 1051—1058.
7. Quantz, L., 1958: Ein Beitrag zur Kenntnis der Erbsenvirosen in Deutschland. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **10**, 65—70.
8. — —, und J. Brandes, 1957: Untersuchungen über ein Steinkleevirus. Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) **9**, 6—10.
9. Wetter, C., und L. Quantz, 1958: Serologische Verwandtschaft zwischen Steinkleevirus, Stauchevirus der Erbse und Wisconsin pea streak Virus. Phytopath. Z. **33**, 430—432.

Aus der
Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für landwirtschaftliche Virusforschung,
Braunschweig

Elektronenmikroskopische Größenbestimmung von acht stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren[1])

Von

J. Brandes

Mit 2 Abbildungen

Anknüpfend an die Vermessungen von stäbchen- und fadenförmigen Pflanzenviren, über die Brandes und Paul (1957) zusammenfassend berichteten, werden im folgenden die morphologischen Daten von 8 weiteren Viren mitgeteilt. Anlage und Auswertung der Versuche sind in der erwähnten Arbeit dargestellt. Neben der Exsudatmethode wurde, vornehmlich bei einigen monocotylen Wirtspflanzen, die Tauchmethode (Brandes 1957) erfolgreich angewandt.

In der Tabelle sind die Ergebnisse der Vermessungen zusammengefaßt. Abbildung 1 zeigt die Verteilungskurven der Teilchenlängen in Form von Treppenpolygonen.

An anderer Stelle wird eine Zusammenfassung der bisher vorliegenden Meßergebnisse gegeben und über die Möglichkeit berichtet, die morphologischen Daten als Grundlage einer Klassifikation der Viren zu benutzen. (Brandes und Wetter 1959).

Zur Durchführung dieser Arbeit wurden mir von verschiedenen Seiten Virusisolate überlassen, wofür ich mich auch an dieser Stelle bedanke.

[1]) In dieser Arbeit werden die vom Internationalen Nomenklatur-Komitee empfohlenen englischen Vulgärnamen der Viren (Rev. appl. Myc. 35; Suppl. 1957) verwendet, die bis zur Einrichtung einer binären lateinischen Nomenklatur als wissenschaftliche Namen gelten sollen. Soweit die Viren in Deutschland vorkommen, werden auch deutsche Vulgärnamen angegeben.

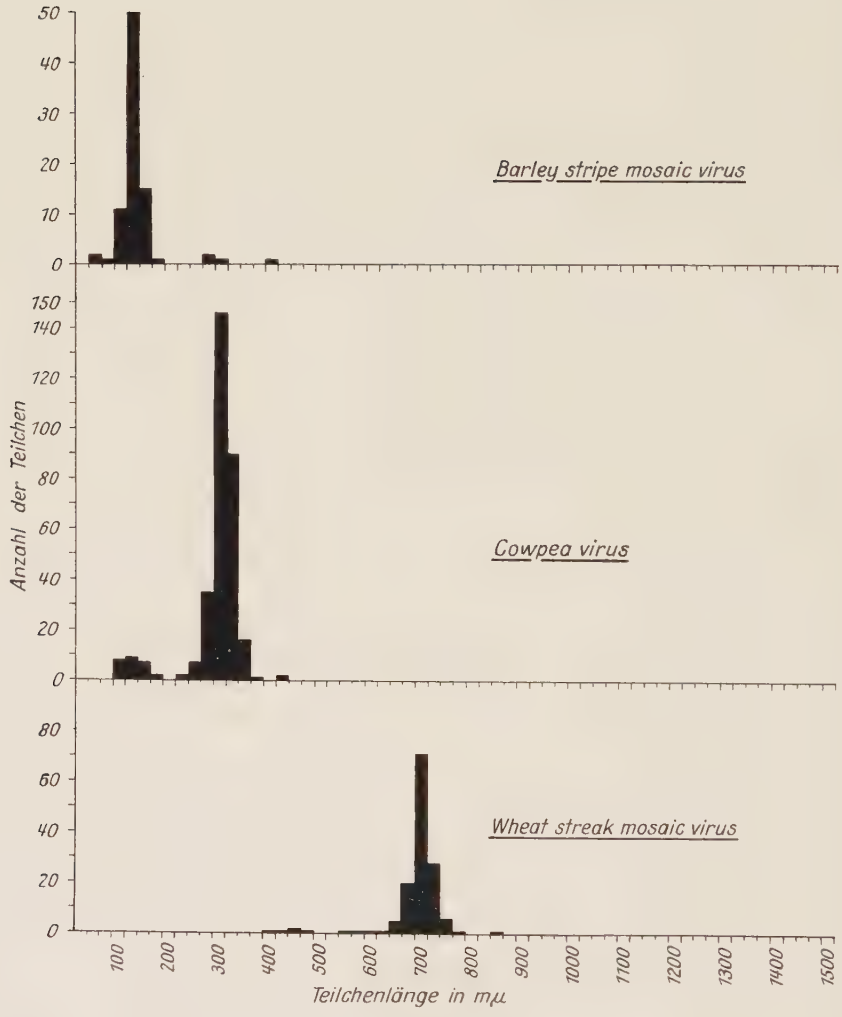


Abb. 1 a

Abb. 1. Häufigkeitsverteilungen

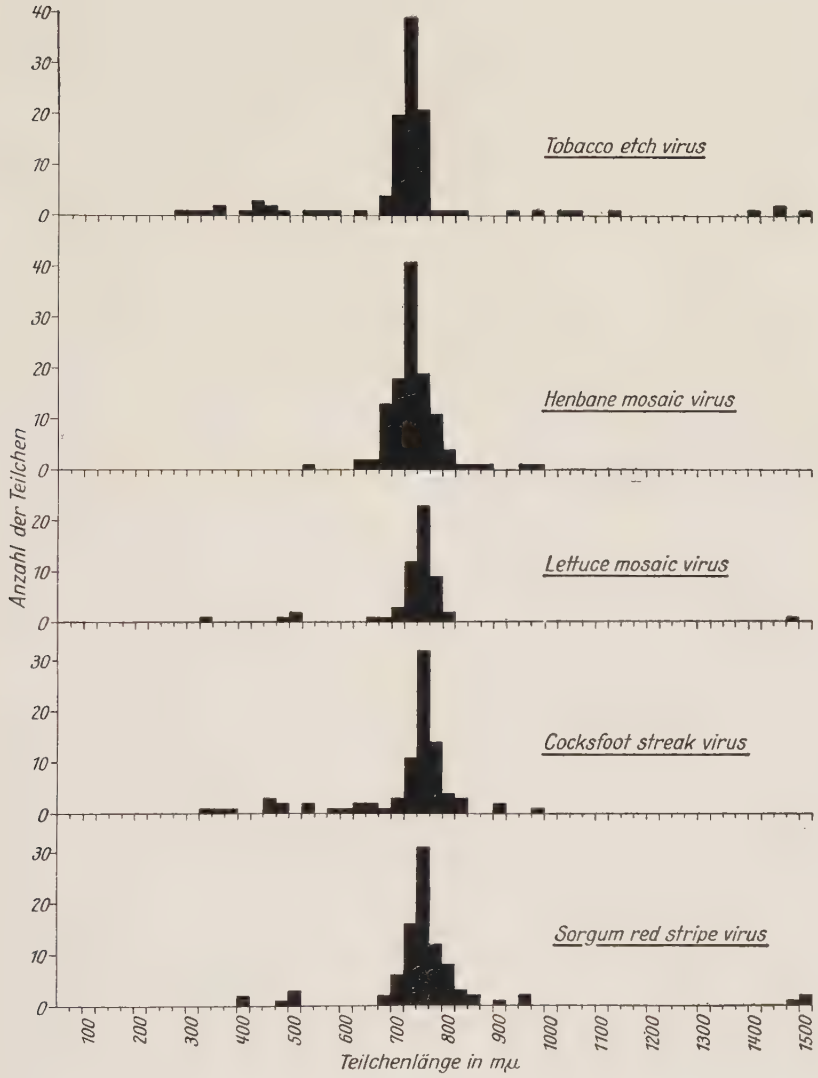


Abb. 1 b

der Partikellängen

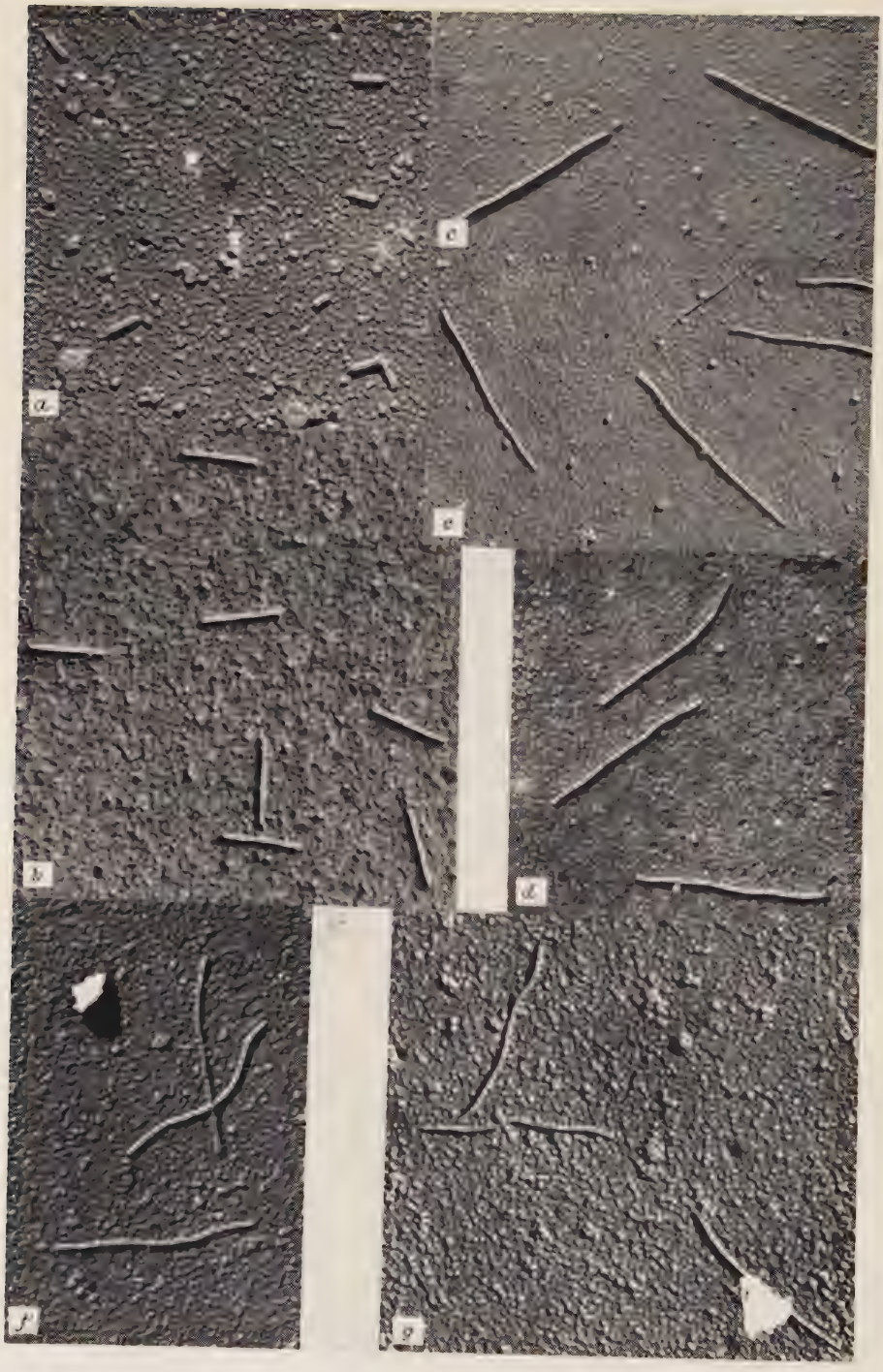


Abb. 2

Morphologische Daten von 8 Pflanzenviren

Virus	Wirtspflanzen	Anzahl der vermessenen Teilchen	Normallänge (mμ)	Dicke (mμ)	Form
Barley stripe mosaic virus (Streifenmosaik-Virus der Gerste) (1)	*Hordeum vulgare*	84	126	20	starre Stäbchen
Cowpea virus (2)	*Phaseolus vulgaris* (Genfer Markt)	325	305	15	starre Stäbchen
Wheat streak mosaic virus (3)	*Triticum aestivum*	141	702	12—13	Stäbchen starr-flexibel
Tobacco etch virus (4)	*Nicotiana tabacum* (Samsun), *Datura stramonium*	111	725	12—13	flexible Fäden
Henbane mosaic virus (4)	*Nicotiana tabacum* (Samsun)	116	724	12—13	flexible Fäden
Lettuce mosaic virus (Salatmosaik-Virus) (5)	*Lactuca sativa*	56	747	12—13	flexible Fäden
Cocksfoot streak virus (Strichelvirus des Knaulgrases) (6)	*Dactylis glomerata*	87	752	12—13	flexible Fäden
Sorgum red stripe virus (7)	*Zea mays*, *Sorgum* spec.	92	750	12—13	flexible Fäden

Anmerkungen zur Tabelle:

1. Bei dem *barley stripe mosaic virus* (Abb. 2 a) handelt es sich um ein Isolat von Slykhuis aus Kanada. Morphologische Daten dieses Virus wurden bereits von Gold, Suneson, Houston und Oswald (1954) mitgeteilt und kürzlich von Pawlitschek (1958) bestätigt. Der in der Tabelle angegebene Wert für die Normallänge (126 mμ) stimmt gut mit denen von Gold und Mitarbeitern (130 mμ) und Pawlitschek (125 mμ) überein. Dickenmessungen im Vergleich mit Tabakmosaik-Virus und *potato stem mottle virus* (Stengelbunt-Virus) ergaben allerdings im Gegensatz zu Gold (30 mμ) und Pawlitschek (25—30 mμ) nur einen Wert von 20 mμ.

2. Das *cowpea virus* (Abb. 2 b) — es handelt sich um die „bean form", auf *Phaseolus vulgaris* kultiviert — stammt von F. C. Bawden. Die Vermutung von Bawden (1958),

Zu Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen typischer Virusteilchen; Vergr. 36 000 ×; Pd-bedampft.

a) *barley stripe mosaic virus* (Streifenmosaik-Virus der Gerste); b) *cowpea virus;* c) *wheat streak mosaic virus;* d) *tobacco etch virus;* e) *henbane mosaic virus;* f) *lettuce mosaic virus* (Salatmosaik-Virus); g) *cocksfoot streak virus* (Strichelvirus des Knaulgrases)

daß dieses Virus kürzer sei als das serologisch verwandte typische Tabakmosaik-Virus, konnte nicht bestätigt werden.

3. Das *wheat streak mosaic virus* (Abb. 2 c) wurde von der American Type Collection bezogen. Die Normallänge liegt mit 702 mμ im Bereich der von Gold, McKinney und Scott (1957) sowie von Brakke und Staples (1958) ermittelten häufigsten Längen.

4. *Tobacco etch virus* (Abb. 2 d) und *henbane mosaic virus* (Abb. 2 e) stammen ursprünglich von Bawden. Sie wurden uns vom Institut für Phytopathologie der Biologischen Zentralanstalt, Aschersleben, zur Verfügung gestellt. Die fadenförmige Gestalt wurde bereits von Bawden und Nixon (1951) beschrieben, die Länge jedoch als variabel bezeichnet.

5. Das Salatmosaik-Virus (Abb. 2 f) wurde von krankem Freilandsalat sowie von Pflanzen, die aus krankem Samen im Gewächshaus gezogen wurden, isoliert. Die von uns ermittelte Normallänge (747 mμ) stimmt mit dem von Couch und Gold (1954) mitgeteilten Wert (746 mμ) überein. Die Dicke der Teilchen — vergleichend mit Tabakmosaik-Virus vermessen — liegt bei etwa 12 bis 13 mμ. Demgegenüber ermittelten Couch und Gold eine Dicke von 22 mμ.

6. Knaulgraspflanzen, infiziert mit *cocksfoot streak virus* (Abb. 2 g), wurden von Bode in der Umgebung Braunschweigs gefunden. Dieses sowie ein von Klinkowski und Kreutzberg (1958) beschriebenes Isolat ergaben bei der Vermessung gleiche Partikellängen.

7. Das in Italien auf Mais und Hirse vorkommende *sorgum red stripe virus* wurde von Grancini isoliert. Auf Grund der Übereinstimmungen im Wirtspflanzenkreis sowie in physikalischen Eigenschaften vermutet Grancini (1957) eine Verwandtschaft mit dem *sugarcane mosaic virus*.

Literaturverzeichnis

Bawden, F. C., 1958: Reversible changes in strains of tobacco mosaic virus from leguminous plants. J. gen. Microbiol. **18**, 751—766.

— —, and H. L. Nixon, 1951: The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. J. gen. Microbiol. **5**, 104—109.

Brakke, M. K., and R. Staples, 1958: Correlation of rod length with infectivity of *wheat streak mosaic virus*. Virology **6**, 14—26.

Brandes, J., 1957: Eine elektronenmikroskopische Schnellmethode zum Nachweis faden- und stäbchenförmiger Viren, insbesondere in Kartoffeldunkelkeimen. Nachr.bl. dtsch. Pfl.schutzd., Braunschweig, **9**, 151—152.

— —, und H. L. Paul, 1957: Das Elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Virosen. Betrachtungen zur Vermessung faden- und stäbchenförmiger Virusteilchen. Arch. Mikrobiol. **26**, 358—368.

— —, and C. Wetter, 1959: Classification of elongated plant viruses on the basis of particle-morphology. Virology, im Druck.

Couch, H. B., and A. H. Gold, 1954: Rod-shaped particles associated with *lettuce mosaic*. Phytopathology **44**, 715—717.

Gold, A. H., H. H. McKinney and H. A. Scott, 1957: A comparative study of virus particles infecting some grasses and other plants (Abstract). IVth Int. Congr. Crop Protection, Hamburg.

— —, C. A. Suneson, B. R. Houston and J. W. Owald, 1954: Electron microscopy and sead and pollen transmission of rod-shaped particles associated with the false stripe virus disease of barley. Phytopathology **44**, 115—117.

Grancini, P., 1957: Un Mosaico del Mais e del Sorgo in Italia. Maidica **2**, 83—104.

Klinkowski, M., und G. Kreutzberg, 1958: Vorkommen und Verbreitung von Gramineenvirosen in Europa. Phytopath. Z. **32**, 1—24.

Pawlitschek, W., 1958: Gestalt und Längenvermessung des Streifenmosaik-Virus der Gerste. Biochim. Biophys. Acta **28**, 650—651.

Besprechungen

Berge, H., Immissionsschäden an landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturen. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg 1958. 24 Seiten. Kartoniert DM 3,—.

Es handelt sich um ein Referat im Rahmen des studium generale der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim. Verfasser weist u. a. darauf hin, daß die durch Immissionsschäden hervorgerufenen Schadensbilder nicht so eindeutig wären, um nicht identisch sein zu können mit Erscheinungsbildern für Nährstoffmangel oder Schädlingsbefall. Allgemeingültige Empfindlichkeitstabellen werden abgelehnt, da die Empfindlichkeit u. a. vom Alter, der Herkunft der Pflanzen sowie von ökologischen Faktoren abhängt. Dem Titel nach zu erwartende Beschreibungen der durch Immission hervorgerufenen Schadbilder werden nicht gebracht, auch keine Beispiele für Schadenserhebungen. In breiter Polemik nimmt der Verfasser zu Versuchen in Biersdorf sowie zu Berichten des VDI über Zementstaubschäden im Raume Wülfrath und zum in jüngster Zeit erschienenen Kartenwerk mit Staubpegelzonen nach Sedimentationsmessungen der Landesanstalt für Bodennutzungsschutz in Bochum Stellung. Der Tenor der Kritik ist der Vorwurf einer Unwissenschaftlichkeit. Unabhängig von einseitigen Interessen und vor allem frei von politischem Druck, so fordert der Verfasser, sollte wie auf anderen wissenschaftlichen Gebieten auch in der Immissionsschadenskunde wieder sorgfältige Forschungsarbeit geleistet werden. Dieser Forderung wird Verfasser in seiner Schrift selbst nur wenig gerecht. So werden Beobachtungen über die Abhängigkeit der Immissionsempfindlichkeit von der Nährstoffversorgung der Pflanzen oder solche über Schäden an Luzerne bei einer unter 0,3 ppm liegenden SO_2-Konzentration ohne irgendwelche Untersuchungsdaten mitgeteilt. Auch z. B. hinsichtlich Auswirkungen von SO_2, H_2SO_4 oder H_2S auf die Lebendverbauung des Bodens oder den Rückgang von *Azotobacter chroococcum* hätte man mehr als nur eine kurze Erwähnung eigener, bisheriger Ermittlungen erwartet, und in dem einzigen Falle, wo eine Tabelle über den Einfluß verschiedener Stäube auf einige landwirtschaftliche Nutzpflanzen gebracht wird, muß man, wenn schon die Forderung nach sorgfältiger Forschungsarbeit gestellt wird, die zur Sicherung der Ergebnisse erforderlichen Angaben der Fehlerschwankungen vermissen. — Pflanzenanalysen werden, gegebenenfalls unter Einschaltung pflanzensoziologischer Aufnahmen insbesondere bei F-Immissionen auf Grünland, als wertvolles Hilfsmittel angesehen, die Luftanalyse ist jedenfalls unentbehrlich, besonders wenn die Frage einer Grenzwertüberschreitung ansteht. Formeln zur Erfassung der Schadensmöglichkeit z. B. bei SO_2-Emittenten seien unangebracht, da sich die Natur bei ihrem steten Wechsel der Umwelt- und Zustandsbedingungen nicht in mathematische Formeln zwingen lasse. — Bemerkenswert ist schließlich die Frage, was man den Bundes- und Länderregierungen zu einer befriedigenden Lösung des Problems der Reinhaltung der Luft vorschlagen solle. Verfasser denkt dabei an die Erstellung von Emittenten-Standortskarten, Immissionskarten nach Luft- und Pflanzenanalysen u. a. m. Im ganzen gesehen werden Studenten, für die das Referat ja wohl in erster Linie gedacht war, in der vorgelegten Schrift vieles vermissen, was der Titel „Immissionsschäden" verspricht. Dem Fachmann bringt sie kaum etwas Neues mit wissenschaftlichem Aussagewert. THEMLITZ, Hann.-Münden

Finkbein, Dr. R., und Dr. R. Graeber. Einfuhrvorschriften zum Schutz der Pflanzenwelt. Loseblattausgabe, in Efantahefter. Verlag Kommentator, Frankfurt (Main) 1958. 105 Seiten. DM 9,80.

Es ist sehr verdienstvoll, daß ein Biologe und ein Jurist gemeinsam das gültige Pflanzenschutzrecht, soweit es die Bundesgesetzgebung betrifft, in einer kleinen Schrift zusammengefaßt und kommentiert haben. Hierfür war jetzt ein besonders günstiger Zeit-

punkt, nachdem durch die Neufassung der Pflanzenbeschauverordnung viele alte Bestimmungen überholt und außer Kraft gesetzt worden sind, wodurch auch ein Zustand beendet wurde, der in der Vergangenheit den Pflanzenschutzdienststellen wie auch dem Ein- und Ausfuhrhandel und nicht zuletzt auch den Verwaltungsgerichten Sorgen und Schwierigkeiten bereitet hat. Die vorliegende Schrift befaßt sich mit dem Gesetz zum Schutze der Kulturpflanzen in der Fassung vom 26. August 1949, mit der Pflanzenbeschauverordnung in der Fassung vom 10. Juni 1958, mit der Verordnung zur Bekämpfung der Bisamratte vom 1. Juli 1938 (im Auszug), mit dem Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut vom 25. September 1957 und auszugsweise auch mit der Naturschutzverordnung in der Fassung vom 16. März 1940. Ferner wird auch auf den Erlaß des Bundesministers der Finanzen betreffs Schutz der Pflanzenwelt (Zollanweisung) vom 9. Oktober 1957 eingegangen.

In der Einleitung wird in knapper Form ein Überblick über die historische Entwicklung dieses heterogenen Rechtsgebietes vermittelt. Der Hauptteil der Schrift enthält eine eingehende Erläuterung der neuen Pflanzenbeschauverordnung. Dies ist besonders zu begrüßen, da die Auslegung gerade dieser Verordnung für die juristisch nicht geschulten Sachverständigen der Amtlichen Pflanzenbeschau oft recht schwierig ist. In dem knappen Wortlaut der Verordnung konnte natürlich nicht auf alle möglichen Einzelfälle, besonders auch im Hinblick auf die recht unterschiedliche Abwicklungstechnik bei der Ein- und Durchfuhr beschaupflichtiger Pflanzen und pflanzlicher Erzeugnisse über die „trockene" Grenze und über die Seehäfen eingegangen werden. Hier kommt es vielfach entscheidend auf die Auslegung der Bestimmungen an. Allerdings erscheinen dem Referenten die Erläuterungen zum § 11 (1) bezüglich der unmittelbaren Durchfuhr durch Freihäfen zu eng gefaßt. Das gleiche gilt auch für die in der Praxis der amtlichen Pflanzenbeschau schon immer recht umstrittene und in § 7 der Pflanzenbeschauverordnung festgelegte Frage der Beibringung von amtlichen Pflanzenschutzzeugnissen aus dem Ursprungsland der eingeführten Ware.

Die vorliegende Schrift kann allen im Pflanzen- und Naturschutz Tätigen, besonders den Sachverständigen der Amtlichen Pflanzenbeschau wärmstens empfohlen werden. Auch die mit den biologischen Problemen nicht näher vertrauten Angehörigen der Zolldienststellen werden großen Nutzen aus dem Studium dieses Büchleins ziehen können. Nicht zuletzt wird es weiten Kreisen des Ein- und Ausfuhrhandels von Nutzen sein, zumal es sehr gut geeignet ist, etwa auftretende Mißverständnisse bei der Auslegung der einschlägigen Bestimmungen von vornherein zu klären. Erfreulich ist auch, daß die Aufmachung als Loseblattausgabe gut geeignet ist, die handliche Schrift stets auf dem neuesten Stand zu halten.

Egle, Hamburg

Handbuch der Pflanzenphysiologie. Herausgegeb. von W. Ruhland. Bd. VI: Aufbau-Speicherung — Mobilisierung und Umbildung der Kohlen-Hydrate. Redigiert von A. Arnold. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958. XXII + 1444 Seiten. Preis DM 268,— (Subskriptionspreis DM 214,40).

Wie in seiner Einleitung der Band-Herausgeber betont, weisen die Kohlenhydrate im Pflanzenreich nicht nur eine allgemeine Verbreitung auf, sondern stehen auch mengenmäßig unter den organischen Verbindungen, die die Pflanzensubstanz aufbauen, an erster Stelle. Es ist deshalb nicht erstaunlich, daß der vorliegende Band von den bisher erschienenen den größten Umfang aufweist, obwohl für die CO_2-Assimilation eine getrennte Darstellung vorgesehen ist. Es ist deshalb in einem Referat nicht möglich, die von 36 Autoren durchgeführte Bearbeitung des Gebietes im einzelnen zu würdigen, schon aus Raumgründen kann hier nur ein allgemeiner Überblick gegeben werden.

Die ersten Kapitel befassen sich mit der chemischen Struktur der Mono- und Oligosaccharide (Shafizadeh und Wolfrom), mit ihrer Synthese und Umwandlung in der Pflanze sowie mit den an diesen Prozessen beteiligten Fermenten (Hassid, Gottschalk). Den Kapiteln über die Polysaccharide geht ein Abschnitt über Struktur, Eigenschaften und

Wachstum der Stärkekörner voraus (Badenhuizen), dann folgen molekularer Bau und Chemie der Stärke und des Glykogens sowie die für Auf- und Abbau dieser Kohlenhydrate wichtigen Fermente (Whelan, Goerdeler). Bei der Behandlung der Pento- und Hexosane nehmen naturgemäß die Zellulosen den breitesten Raum ein (Neumüller, Romby, Preston). Den Phytopathologen werden hier die Ausführungen über die Fermente der Zellulosechemie (Fåhraeus) besonders interessieren. Ein eigener Abschnitt ist den Polysacchariden und den entsprechenden Fermenten der niederen Pflanzen gewidmet (Foster und Stacey). Es folgen Kapitel über polyhydrische Alkohole (Glykite) (Bourne). Inosite (Dangschat), Aldonsäuren (Vollmert) sowie Uron- und Polyuronsäuren (Henglein). Hier sind die Pektine und besonders die Pektinasen für die Phytopathologie von großem Interesse. Abhandlungen über Ascorbinsäure (Åberg), Gummi- und Schleimstoffe der Pflanzen (Hirst und Jones), über Aminozucker und Chitin (Foster und Stacey) schließen sich an. Phosphorylierte Zucker und phosphorilierende Fermente werden nur ganz kurz behandelt (Albaum), da eine eingehendere Darstellung in anderen Bänden erfolgt. Einen sehr breiten Raum — fast ein Viertel des ganzen Textteiles — nehmen die Heteroside (Glycoside) (Stoll und Jucker, Kerstan) einschließlich der Heterosidasen (Veibel) ein. Eine Aufzählung der im Pflanzenreich vorkommenden Glycoside und eine Berücksichtigung ihrer Verbreitung im Pflanzenreich (über 200 Seiten!) ist sehr eindrucksvoll und aufschlußreich, nur kann man darüber geteilter Meinung sein, ob der vorliegende Band für diese reine Aufzählung der richtige Ort ist. Der sich mit dem Stickstoffumsatz befassende Band bringt z. B. im Alkaloid-Kapitel keine entsprechende Aufzählung der einzelnen Alkaloide. Die Übersicht über die einzelnen Glycoside hätte wohl besser in den Band X: „Der Stoffwechsel sekundärer Pflanzenstoffe" gepaßt. Weitere Kapitel behandeln die morphologisch-anatomischen Grundlagen (Weber) und den Mechanismus der Kohlenhydratspeicherung (Wanner, Miller, Wolf, Young), den Transport der Kohlenhydrate (Fischer) sowie ihre Mobilisierung bei der Keimung (Wanner), die Tagesperiodizität ihrer Auswanderung aus dem Blatt und die jahresperiodische Auswanderung aus den Speichergeweben, ferner die herbstliche Rückwanderung (Fischer) und die Exkretion der Kohlenhydrate (Nektarien) (Helder) sowie die Beziehungen der Kohlenhydrate zum übrigen Stoffwechsel (Arnold). Sehr zu begrüßen ist das Schlußkapitel: „Nomenklatur der Kohlenhydrate" (Wagner), da im angelsächsischen Sprachgebiet verbindliche Nomenklaturregeln für die Kohlenhydrate aufgestellt worden sind, die im deutschen Sprachgebiet noch fehlen. Die angelsächsische Nomenklatur läßt sich aber auch nicht ohne weiteres übernehmen, so daß dem zweisprachigen Sachregister in diesem Band eine besondere Bedeutung zukommt. Fast ein Drittel des Gesamtumfangs geht allerdings auch auf das Namenverzeichnis (64 Seiten) und das zweisprachige Sachverzeichnis (je 172 Seiten). Diese Ausführlichkeit erleichtert aber ungemein das Auffinden auch ganz spezieller Vorgänge und Stoffe, so daß der vorliegende Band im wahrsten Sinne des Wortes ein ausgezeichnetes „Nachschlagewerk" ist, das uns zuverlässig über die skizzierten Gebiete des Kohlenhydratstoffwechsels in chemischer und physiologischer Hinsicht unterrichtet.

H. Drawert, Berlin-Dahlem

Handbuch der Pflanzenphysiologie. Herausgegeb. von W. Ruhland. Bd. VIII: Der Stickstoffumsatz. Redigiert von K. Mothes. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958. XXI + 1310 Seiten, 50 Abbildungen. Preis DM 286,— (Subskriptionspreis DM 228,80).

34 Autoren bearbeiten im vorliegenden Band alle Fragen der Stoffwechselphysiologie, die mit dem Stickstoff zusammenhängen, von der Assimilation über den Abbau bis zu den N-haltigen sekundären Pflanzenstoffen und der Bedeutung pflanzlicher Eiweiße für die animalische Ernährung. Nach einer Einleitung des Bandherausgebers, in der auch kurz die Symptome einer Stickstoffmangelkrankheit gestreift werden, erfährt man Näheres über die asymbiotische (Wilson) und die symbiotische N-Bindung (E. K. und O. N. Allen) durch Mikroorganismen. Im letzten Kapitel stehen naturgemäß die Leguminosen mit *Rhizobium* im Mittelpunkt. Weitere Abschnitte befassen sich mit dem gebundenen Stickstoff des Bodens und der Gewässer und seiner Verwertbarkeit (Manshard, Scheffer),

mit der Aufnahme von Nitraten, Ammonium (Street und Sheat) und Nitriten (Mevius) sowie der Reduktion und Speicherung der Nitrate (Spencer) und Oxime und Hydroxylamin als Zwischenstufen der Assimilation (Rautanen). Es folgen Abhandlungen über die Synthese der Aminosäuren in den Pflanzen (Loomis), über Transamination und Transamidation und die spezifische Rolle einzelner Aminosäuren im pflanzlichen Stoffwechsel (Loomis und Stumpf) bis zu den speziellen pflanzlichen Peptiden und Eiweißkörpern (Waley, Haurowitz, Waldschmidt-Leitz). Ein Kapitel bringt auch etwas über die Lokalisation der Proteine und Peptide in den Zellen und Geweben (Yemm). Über den Rahmen einer reinen Pflanzenphysiologie hinaus führt das Kapitel: „Die ernährungsphysiologische Bedeutung der Eiweißpflanzen und Pflanzeneiweiße" (Täufel), das in diesem Zusammenhang aber doch sehr zu begrüßen ist. Ferner sind 58 Seiten der Serologie pflanzlicher Eiweißkörper gewidmet (Moritz). Weitere Abschnitte befassen sich mit dem Mechanismus im Auf- und Abbau von Proteinen (Yemm), ihrer identischen Reproduktion (Schramm), den Enzymen des Eiweißumsatzes (Waldschmidt-Leitz) und dem Eiweißwandel im Zellkern (Caspersson). Je ein besonderes Kapitel behandelt den N-Stoffwechsel in Keimlingen, Blättern, Blüten, vegetativen Speicherorganen, Samen und Früchten (McKee), Pilzen (Nielsen), Algen (Haas) und Bakterien (McQuillen). Kurz wird auch auf den Transport des organisch gebundenen Stickstoffs in der Pflanze eingegangen (Fischer). Es folgen Darstellungen des Abbaus der Aminosäuren (Street), über Ammoniakentgiftung und Aminogruppenvorrat (Mothes), des Stoffwechsels der Purine, Pyrimidine und Nucleinsäuren (Böttger). Ringschluß mit N und Methylierung am N behandelt Schröter, und Guggenheim schildert die biogenen Amine in der Pflanzenwelt, während Mothes und Romeike die chemischen Grundlagen und die Physiologie der Alkaloide darstellen. Als weitere Stickstoffverbindungen sind besondere Abschnitte den Blausäureabkömmlingen (Dillemann) und dem Melanin (Thomas) gewidmet. Über Denitrifikation und Nitrifikation berichtet Engel, und eine kurze Abhandlung über die geochemische Bedeutung des Stickstoffs unter besonderer Berücksichtigung der landwirtschaftlichen Produktion und der Dünger (Schmalfuss) beendet den Textteil des Bandes, dem sich 164 Seiten Autorenverzeichnis und zweisprachiges Sachregister anschließen.

Abhandlungen über sehr nahverwandte Gebiete durch verschiedene Autoren bieten ohne Zweifel ihren besonderen Reiz. Es fragt sich aber, ob diese Methode für ein Handbuch die richtige ist, da hier die Gefahr zu starker Überschneidungen gegeben ist und nur durch ein rücksichtsloses Eingreifen des Herausgebers gebannt werden kann. Dieser Gefahr ist im vorliegenden Band nicht nur gesteuert, sondern sogar der Boden bereitet worden durch eine zu weit gehende Aufsplitterung des Stoffes und zu verwandte Themenstellung vor allem im ersten Teil des Bandes. Es ist nicht einzusehen, daß zwei besondere Kapitel mit folgenden Überschriften geschaffen werden, die dann auch noch von zwei verschiedenen Autoren bearbeitet worden sind: „Herkunft und Vorkommen von gebundenem Stickstoff in Boden und Gewässern (Assimilierbarkeit)" und „Der organisch gebundene Stickstoff des Bodens, seine Verwertbarkeit (auch Harnstoff)". Dies muß notgedrungen entweder zu beträchtlichen Überschneidungen führen, oder bei zu starker Rücksichtnahme aufeinander kann keines der beiden Kapitel zu einer wirklich abgerundeten Darstellung kommen. Bei einer zusammenhängenden Durcharbeitung des Bandes wirken die vielen Wiederholungen ermüdend. Es sei hier nur auf das von Hopkins isolierte Glutathion, auf die Transamination und die symbiotische und nichtsymbiotische N-Bindung hingewiesen, über die man von den verschiedensten Seiten unterrichtet wird. Den Stoff auf die Hälfte der Mitarbeiter verteilt, oder ein starker Schnitt durch den Herausgeber, hätte wohl zu einem abgerundeteren und eindringlicheren Bild vom Stickstoffumsatz geführt. Von den bisher erschienenen Bänden des Handbuchs ist in dieser Hinsicht wohl Band III „Pflanze und Wasser", trotz der auch bei diesem Bande gemachten Bemerkungen (vgl. Phytopath. Z. 29, 231, 1957), am besten gelungen. Hinterher Kritik zu üben ist aber ein sehr leichtes Unterfangen, und wir dürfen darüber nicht die viele Mühe und Arbeit der Herausgeber und Mitarbeiter vergessen, die in so einem Werk enthalten ist, und ihnen dafür unseren Dank aussprechen. Ferner dürfen wir auch nicht die undankbare Aufgabe des Herausgebers übersehen, dessen wohldurchdachter Plan an einigen nicht einsichtsvollen Mitarbeitern scheitern kann.

H. Drawert, Berlin-Dahlem

Klinkowski, M., Pflanzliche Virologie. I. Einführung in die allgemeinen Probleme. X u. 279 Seiten, 103 Abbildungen, 16 Tabellen, geb. 33,— DM. II. Die Virosen des europäischen Raumes. VI u. 393 Seiten, 251 Abbildungen, geb. DM 48,—. Akademie-Verlag, Berlin, 1958.

Die „Pflanzliche Virologie" ist unter Mitwirkung von Fachleuten des Phytopathologischen Instituts der Universität Halle-Wittenberg, des Instituts für Phytopathologie Aschersleben, der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig und der Biologischen Bundesanstalt Berlin-Dahlem entstanden. Der Herausgeber hat — soweit er sich bestimmte Kapitel nicht selbst zur Bearbeitung vorbehielt — geeignete Sachkenner mit langjähriger Erfahrung für Teilgebiete gewinnen können, durch die eine gediegene Abfassung der ihnen zugewiesenen Abschnitte unter Berücksichtigung des Wesentlichen gewährleistet war.

Eine im Preis erschwingliche Darstellung der Grundtatsachen der pflanzlichen Viruskunde, des Rüstzeugs, das jeder braucht, der mit pflanzlichen Viren arbeiten will, fehlte bisher in deutscher Sprache. Insofern hilft besonders der erste Band einem dringenden Bedürfnis ab. Das im ersten Band Gebotene (u. a. Diagnostik, Übertragungsmöglichkeiten der Viren, Morphologie, Serologie, physikalisch-chemische Eigenschaften, Systematik) geht trotz seiner gedrängten Darstellung über das hinaus, was man von einer „Einführung in die allgemeinen Probleme" erwartet, bleibt aber auch für den, der in die Fragen der pflanzlichen Viruskunde eingeführt werden möchte, durchaus verständlich. Hierzu trägt nicht zuletzt das im Anhang gebrachte Kapitel „Kleines virologisches Praktikum" bei, dessen Einfügung in eine „Pflanzliche Virologie" zunächst etwas befremdet. Aber gerade dieses Kapitel enthält sehr anschauliche zum Verständnis der theoretischen Kapitel erwünschte Bilder. Die Abbildungen aller Kapitel sind — abgesehen von einer gewissen Großräumigkeit bei den Blattlausbildern — gut ausgewählt. Vielleicht sollte man auch dem Kapitel Serologie einige demonstrative Abbildungen zugestehen (oder zumindest auf die Bilder des Anhangs verweisen).

Auch die Bearbeitung der Kapitel des 2. Bandes ist auf verschiedene Sachbearbeiter verteilt worden. Im einzelnen werden behandelt: Die Virosen der Kartoffel und des Tabaks, der Beta- und Brassica-Arten, der Leguminosen, der Gemüsepflanzen, der Tomate, des Kern-, Stein- und Beerenobstes, der Zierpflanzen und sonstige Virosen. Außer dem Sachregister sind diesen Kapiteln ein dreisprachiges Test- und Wirtspflanzenverzeichnis (lateinisch—deutsch—englisch) und ein Kapitel Virus übertragende Blattläuse und ihre Synonyme angefügt worden. Die reich bebilderten Abschnitte über die Virosen sind sehr übersichtlich gegliedert. Unter der deutschen Überschrift der Krankheit folgen Angaben über das Krankheitsbild, den Wirtspflanzenkreis, die physikalisch-chemischen und die morphologischen Eigenschaften des Virus, über Testpflanzen, über Art der Übertragung, die Bekämpfung und die Verbreitung in Europa. Die Angaben sind zum Teil kurz, reichen aber zur Diagnose der Viruskrankheit im allgemeinen aus.

Beiden Bänden ist eine weite Verbreitung in Phytopathologen-Kreisen sicher.

K. Heinze, Berlin-Dahlem

Schuster, G., Virus und Viruskrankheiten. Die neue Brehm-Bücherei Heft 198. Wittenberg 1957. 79 Seiten mit 34 Abb. Kart. DM 5,20.

Das vorliegende Heft soll dem Bedürfnis nach rascher Information „bei Lehrenden und Lernenden an allgemeinbildenden Schulen und Fachschulen als auch bei vielen erfahrenen Praktikern" Rechnung tragen. Wenn dieser Leserkreis angesprochen wird, ist es wichtig, bei der Beschränkung des Umfanges aus der Fülle des Materials unnötigen Ballast fortzulassen und eine klare, leichtverständliche Art der Darstellung zu wählen. Vor allen Dingen sollte der Leser gerade bei diesem Fachgebiet Gesichertes von Hypothetischem trennen können.

Das ist dem Autor leider nicht immer gelungen. Eine so ausführliche Abhandlung des Elektronenmikroskops unter Anführung verschiedener Formeln und mit dreiseitigen Abbildungen über Geräte und Strahlengang ist zur Erklärung morphologischer Eigenschaften der Viren keinesfalls erforderlich. Begriffe wie Eiweiß, Nukleinsäure und Nukleo-

proteid werden oft in unklarer Form angewandt. Neben Wichtigem wird oft Unwesentliches in gleicher Betonung dargestellt. Hypothetisches ist vom Gesicherten nicht immer zu unterscheiden; vielfach werden einseitig nur Hypothesen eines Forschers wiedergegeben.

Bedenklich sind aber Behauptungen wie: „bemerkenswert, daß vollständige Rückbildungsreihen von den Bakterien bis zu den als reine Nukleoproteide nachgewiesenen Viren verfolgt werden können" (S. 21); oder „Chemische Analysen zeigten, daß die isolierten Virussubstanzen weitgehend der Zusammensetzung der Eiweißstoffe des Zellkerns pflanzlicher oder tierischer Zellen entsprechen" (S. 6). Auch dürfte kaum zu vertreten sein, wenn „diese nukleinsäurefreien Partikel aus Virusprotein ... als Vorstufe der aktiven Virusteilchen angesehen" werden (S. 25).

Wesentlich übersichtlicher und klarer ist der II. Abschnitt, der sich mit den pflanzenpathogenen Viren befaßt, abgehandelt. Besonders ausführlich werden die Krankheiten der Kartoffel, in kürzerer Form verschiedene Virosen anderer Kulturpflanzen erklärt. Unklarheiten sind aber auch hier vorgekommen; Angaben über finanzielle Ausnützung von Verfahren, wie z. B. für den IGEL-LANGE-Test mit Aufführung des Gewinns in verschiedenen Währungen, sollten besser unterbleiben. In weiteren Kapiteln werden Bakteriophagen und zoopathogene Viren beschrieben.

Die Abbildungen erscheinen zum Teil schlecht. Für die Wiedergabe der Viruspartikeln sollten besser statt der schematischen Zeichnungen gute elektronenmikroskopische Aufnahmen gewählt werden; Umrißzeichnungen, wie z. B. für das Kartoffel-Y-Virus, besagen nichts.

Das Büchlein gibt sicher, besonders im speziellen Teil, einen gewissen Überblick über das Gesamtgebiet der Virusforschung, jedoch wäre bei einer Neuauflage eine gründliche Ausmerzung der zahlreichen Unebenheiten wünschenswert. BODE, Braunschweig

Soeben erschien:

DIE PAPPEL

Anbau · Pflege · Verwertung

Ein Leitfaden für die Praxis

Unter der Redaktion von Prof. Dr. HERBERT ZYCHA bearbeitet von

Prof. Dr. HERBERT ZYCHA
Biologische Bundesanstalt, Institut für Forstpflanzenkrankheiten, Hann. Münden

Dozent Dr. ERNST RÖHRIG
Institut für Waldbau-Technik der Universität Göttingen, Hann. Münden

Dipl.-Forstw. BRUNO RETTELBACH
Deutscher Pappelverein und Lignikultur, Landesgruppe Bayern e. V., München

Dozent Dr. WOLFGANG KNIGGE
Institut für Forstbenutzung der Universität Göttingen, Hann. Münden

1959. 121 Seiten mit 57 Abbildungen. In Ganzleinen DM 14,—

Als guter und schneller Holzproduzent, der sich sehr gut auch zum Anbau außerhalb des Waldes eignet, erfreut sich die Pappel zunehmender Beliebtheit. Ihr Anbau setzt sich seit einer Reihe von Jahren immer mehr durch; gleichzeitig häufen sich aber auch Rückschläge und Ausfälle, die durch falsche Sortenwahl, falschen Standort, durch Schädlinge und Krankheiten verursacht werden. Wer schwerwiegende Fehler vermeiden und mit Sicherheit Erfolge erzielen will, kann auf ein Fachbuch nicht verzichten, das — wissenschaftlich einwandfrei — ihm alle auf dem Wege zu rationeller Pappelwirtschaft auftretenden Fragen praxisnah beantwortet.

Ein solches Buch ist nun erschienen. Seine Autoren, vier der Praxis besonders eng verbundene Wissenschaftler, haben sich die Aufgabe gestellt, die wertvollen Erkenntnisse und Erfahrungen, die Forschung und Praxis in den letzten zehn Jahren im Pappelanbau gewonnen haben, auszuwerten und sie in einer zusammenfassenden, nicht zu umfangreichen Bearbeitung dem weiten Kreis der Pappelanbauer zugänglich zu machen. Es entspricht dem Charakter des Buches als „Leitfaden für die Praxis", daß dabei alles Unwesentliche oder Problematische zugunsten der klar herausgearbeiteten gesicherten Erkenntnisse zurücktreten mußte. Nur so ließ sich auch der umfangreiche Stoff auf nicht mehr als hundertzwanzig Seiten bewältigen.

Von der Baumschule bis zur Holzernte führen die sieben Kapitel, von denen je eines mit den Arten und Sorten der Pappel vertraut macht, Verständnis für die richtigen Standorte weckt, alles Wissenswerte über Anbau und Pflege vermittelt, Krankheiten und Schädlinge beschreibt, den Ertrag abschätzt und über Eigenschaften, Ernte und Verwertung des Holzes unterrichtet. Ein Verzeichnis der wichtigsten Spezialliteratur und ein ausführliches Sachregister vervollständigen das Buch, das zum unerläßlichen Rüstzeug jedes haupt- oder nebenberuflichen Pappelanbauers gehört.

VERLAG PAUL PAREY / HAMBURG UND BERLIN

Seit April 1959 erscheint in Lieferungen die umfassende Dendrologie

HANDBUCH DER LAUBGEHÖLZE

Herausgegeben von GERD KRÜSSMANN

Leiter des Botanischen Gartens Dortmund-Brünninghausen

Zwei Bände im Gesamtumfang von etwa 900 Textseiten und etwa 300 Kunstdrucktafelseiten, mit insgesamt vielen Hunderten von Abbildungen im Text und auf den Tafeln.

Das Bedürfnis nach einem modernen, möglichst vollständigen Werk über Laubgehölze war der Anlaß, dieses neue, großangelegte Handbuch über alle in Europa vorkommenden winterharten Laubgehölze — mit Ausnahme spezieller Mittelmeerflora — herauszugeben. GERD KRÜSSMANN ist als Autor mehrerer erfolgreicher Gehölzfachbücher, als Herausgeber der Zeitschrift „Deutsche Baumschule" und als Sekretär der Internationalen Dendrologischen Union im In- und Ausland als besonderer Fachkenner in Gehölzfragen bekannt.

Das Kernstück des Werkes ist die Beschreibung aller in Betracht kommenden Laubgehölze. Das Schwergewicht liegt dabei auf der exakten, kurz gefaßten, aber alles Wesentliche enthaltenden Darstellung und auf den Hinweisen über die Verwendungsmöglichkeiten und Lebensansprüche dieser Pflanzen. Weitere Angaben betreffen Herkunft, Winterhärte, Einführung in die gärtnerische Kultur, Abbildungsnachweise usw. Die Gehölze werden in alphabetischer Folge, mit zusätzlicher Angabe der Synonyme aufgezählt. Die Nomenklatur entspricht dem neuesten Stand der Internationalen Nomenklaturvereinbarungen.

Die Illustrierung kann als ein besonders wertvoller Bestandteil des neuen Handbuches angesehen werden. Neben ausgesucht schönen Fotografien und botanisch exakten Zeichnungen werden sogenannte Naturdrucke abgebildet, die eine weder durch Zeichnung noch durch Fotografie erreichbare Genauigkeit und Vollendung der Bildwiedergabe ermöglichen. Für den großen Kreis der Interessenten aus allen Gebieten des Gartenbaues und alle naturkundlich ernsthaft interessierten Menschen wird das „Handbuch der Laubgehölze" ein wertvolles Nachschlagewerk sein und dazu beitragen, die Freude an der Vielgestaltigkeit dieser Pflanzengruppe vertiefen zu helfen.

INHALT:

ALLGEMEINER TEIL. Einführung in die Terminologie · Verzeichnis botanischer Autoren und Gärtner, nebst Abkürzungen ihrer Namen · Erklärung der verwendeten Zeichen · Übersichtskarte über den Geltungsbereich des Buches mit Erläuterungen.

BESCHREIBENDER TEIL. Aufzählung der Gattungen in alphabetischer Reihenfolge · Liste der Abkürzungen für Hinweise auf Abbildungen.

ANHANG. Beschreibendes Verzeichnis der wichtigsten Arboreten Europas · Verzeichnis der Synonyme · Landkarten von Nordamerika, Ostasien, Europa.

ERSCHEINUNGSWEISE, LIEFER- UND BEZUGSBEDINGUNGEN

Das „Handbuch der Laubgehölze" umfaßt zwei Bände im Gesamtumfang von etwa 900 Textseiten und etwa 300 Kunstdrucktafelseiten mit insgesamt vielen Hunderten von Abbildungen im Text und auf den Tafeln. Um seine Anschaffung zu erleichtern, erscheint es zunächst in etwa 12 Lieferungen zu einem ermäßigten Subskriptionspreis. Ab April 1959 ist vierteljährlich das Erscheinen je einer Lieferung mit etwa 72 Textseiten und etwa 24 Kunstdrucktafelseiten vorgesehen. Der Subskriptionspreis einer Lieferung beträgt DM 18,60. Mit der Schlußlieferung jedes Bandes wird eine Einbanddecke zum Preis von DM 4,— geliefert.

Die Subskription verpflichtet zur Abnahme des gesamten Werkes. Der Subskriptionspreis gilt bis zum vollständigen Erscheinen der beiden Bände. Es tritt sodann ein neuer Preis in Kraft, der mindestens 10 % höher sein wird als der Subskriptionspreis.

Auf Wunsch des Bestellers kann das Handbuch entweder in der Lieferungsausgabe oder in kompletten Bänden bezogen werden.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG